

**KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN
DES TEMPERATUREINFLUSSES AUF DIE
STRUKTUR VON RIBONUCLEASE**

Werner Müller

1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für klinische Chemie und klinische Biochemie
der Universität München

komm. Direktor: Priv. Doz. Dr. Hans Fritz
und

aus dem Institut für Technische Chemie I der
Technischen Universität München
komm. Verwalter: Priv. Doz. Dr. E. Killmann

KINETISCHE UNTERSUCHUNGEN DES TEMPERATUREINFLUSSES
AUF DIE STRUKTUR VON RIBONUCLEASE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Dr. rer. nat. Werner Müller
aus Chemnitz

1974

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Hans Fritz
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Gerhard Talsky
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	23.12.74



meiner lieben Frau

Gabriele

gewidmet

Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. G. Talsky bin ich für die in hohem Maße bewiesene Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit zu großem Dank verbunden.

Ebenso bin ich Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. H. Fritz für seine Ratschläge bei der Abfassung dieser Arbeit und für ihre Befürwortung als medizinische Doktorarbeit zu Dank verpflichtet.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Verwendete Abkürzungen	II
Zusammenfassung	III
1. Einleitung	1
1.1. Allgemeines über den Mechanismus der Protein-Denaturierung	1
1.2. Ribonuclease als "Pionier-Enzym"	2
1.3. Ergebnisse der Denaturierungsuntersuchungen an Ribonuclease	3
2. Problemstellung	6
3. Durchgeführte Messungen	7
3.1. Ansatz und Auswertung der Messungen	7
3.2.1. Abhängigkeit der Bruttoreaktionsgeschwindigkeit v_{br} von T und pH	8
3.2.2. Auswertung der Meßergebnisse	9
3.2.2.1. pH-Optimum bei verschiedenen Temperaturen	9
3.2.2.2. Abhängigkeit der mittleren Temperatur T_m der Unstetigkeitsstelle vom pH-Wert	9
3.2.3. Temperaturabhängigkeit der Konstanten K_m und V_{max}	10
3.2.4. Abhängigkeit der experimentellen Aktivierungsenergie E_{exp} vom pH-Wert	12
4. Diskussion der Ergebnisse	13
4.1. Durch welchen Reaktionsschritt wird die Unstetigkeit bedingt?	13
4.2. In welchem Enzymbereich läuft die Umlagerung ab?	16
5. Anhang	23
5.1. Reagentien und Lösungen	23
5.2. Apparatur	24
5.3. Meßvorgang	24
Tabellen	29
Abbildungen	34
Literatur	48

In der vorliegenden Arbeit verwendete Abkürzungen:

RNase:	Ribonuclease aus Rinderpankreas (EC 2.7.7.16)
RNS:	Ribonucleinsäure
C:p:	cyclisches Cytidin-2', 3'-monophosphat
U:p:	cyclisches Uridin-2', 3'-monophosphat
2'-CMP:	Cytidin-2'-monophosphat
3'-CMP:	Cytidin-3'-monophosphat
5'-CMP:	Cytidin-5'-monophosphat
3'-UMP:	Uridin-3'-monophosphat

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit behandelt enzymkinetische Untersuchungen an Ribonuclease aus Rinderpankreas (RNase).

Es wurde dabei das Ziel gesetzt, die Ursache der in der Literatur (50) erwähnten Unstetigkeitsstelle im ARRHENIUS-Diagramm bei der Hydrolyse von cyclischem Cytidin-2',3'-monophosphat (C:p) durch RNase auf molekularer Basis zu erklären.

Dazu wurden ARRHENIUS-Diagramme der genannten enzymatischen Reaktion bei pH-Werten zwischen 6,3 und 8,3 im Temperaturbereich von 3° C bis 27° C aufgenommen und aus ihnen folgende Größen ermittelt: Fehlerbreite, mittlere Temperatur T_m der Unstetigkeitsstelle und die experimentelle Aktivierungsenergie unterhalb ($E_{\text{exp},1}$) und oberhalb ($E_{\text{exp},2}$) der Unstetigkeit. Weiterhin wurde bei pH 7,15 die Temperaturabhängigkeit der MICHAELIS-Konstanten K_m und die von V_{max} ermittelt.

Diese Messungen erbrachten folgende Ergebnisse:

1. Die experimentellen Aktivierungsenergien nehmen beide gleichlaufend mit steigendem pH-Wert ab. Dabei ist stets $E_{\text{exp},1}$ im Mittel um 4,3 kcal/Mol größer als $E_{\text{exp},2}$ (Abb. 5).
2. Die Temperaturabhängigkeit von K_m zeigt in logarithmischer Auftragung von K_m gegen die reziproke Temperatur eine Unstetigkeit, die bei der gleichen Temperatur liegt wie die Unstetigkeit der Bruttoreaktionsgeschwindigkeit v_{br} im ARRHENIUS-Diagramm. Demgegenüber weist V_{max} bei gleicher Auftragungsart keine Unstetigkeit auf.
3. Die mittlere Temperatur T_m der Unstetigkeitsstelle zeigt in Abhängigkeit vom pH-Wert einen S-förmigen Verlauf. Der Wendepunkt liegt bei pH 7,1; die Temperaturen, denen sich T_m oberhalb und unterhalb dieses Wendepunktes asymptotisch annähert, betragen 14° C und 6,9° C; die Breite des S-förmigen Verlaufes überstreicht ca. 1,5 pH-Einheiten.

Aus diesen experimentellen Ergebnissen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Die MICHAELIS-Konstante K_m zeigt immer bei gleicher Temperatur

eine Unstetigkeit wie v_{br} , wenn man beide Größen nach ARRHENIUS aufträgt. Die Anomalie ist somit auf eine Enzym-Umlagerung zurückzuführen, die die Anlagerung des Substrates an das Enzym beeinflusst. Die Abreaktion des gebildeten ES-Komplexes zu Enzym und Produkt zeigt nur einen linearen Temperatureinfluß (siehe auch (50) und (68)).

2. Die Lage des Wendepunktes der S-förmigen pH-Abhängigkeit von T_m bei pH 7,1 deutet darauf hin, daß die Veränderung des Anlagerungsschrittes von Substrat an RNase in einer Umlagerung eines Histidinrestes zu suchen ist. Trotz des großen Untersuchungsmaterials, das bisher über die vier RNase-Histidine bezüglich ihres pK-Wertes vorliegt, gelang es jedoch nicht, eine exakte Zuordnung der Umlagerung entweder zu Histidin 48 oder zu Histidin 119 zu treffen.

1. Einleitung

Die bisherige Enzymforschung läßt verschiedene Abschnitte erkennen, deren Hauptaugenmerk auf unterschiedliche Zielsetzungen gerichtet war. Zunächst sind dies die Problemkreise der Enzymisolierung, daran anschließend die der Strukturaufklärung mit chemischen Methoden und der Untersuchung der Kinetik der Enzymwirkung, also bevorzugt Arbeiten am nativen Enzym. Auch Studien der Proteindenaturierung wurden mehr in der Absicht durchgeführt, neue Aspekte über das native Protein zu gewinnen, als daß man sich dadurch Aufschluß über den Denaturierungsvorgang selbst erwartete. Dies ist auch erklärlich, da ein Verständnis für den Verlust der nativen Enzymstruktur die Kenntnis letzterer voraussetzt; auch sollten die Kräfte, welche die native Struktur erhalten, bekannt sein.

Die Aufklärung der räumlichen Struktur des Myoglobins im Jahre 1961 (1) und die folgenden Bestimmungen von Raumstrukturen anderer nativer Enzyme machten es erst möglich, auf gesicherten Grundlagen das Problem des Denaturierungsvorganges selbst aufzugreifen.

1.1. Allgemeines über den Mechanismus der Protein-Denaturierung

Untersuchungen über die Entfaltung und Rückfaltung von Proteinen stellen einen nützlichen Zugang zum Verständnis der Beziehungen dar, welche zwischen der Primär- und der Sekundärstruktur bestehen. Informationen, welche den Weg vom nativen zum denaturierten Protein oder umgekehrt beinhalten, müssen auch aussagen, ob dieser Weg über Zwischenstufen verläuft oder nicht, da diese Unterscheidung für thermodynamische Studien von großer Bedeutung ist.

Da Zwischenstufen bei der Enzymdenaturierung zunächst nicht festgestellt werden konnten und keinerlei Meßergebnisse zu ihrer Postulierung zwangen, legte man dem Denaturierungsvorgang generell einen 2stufigen Mechanismus zugrunde (siehe Übersicht bei R. LUMRY und R. BILTONEN (2)), auch "Alles oder Nichts" Denaturierung genannt. Dieser Begriff beinhaltet eine Diskontinuität der thermodynamisch definierten Zustände mit einer derartigen Schärfe des Überganges, daß nur ein thermodynamischer

Zustand unterhalb und einer oberhalb der maßgeblichen "Übergangs- oder Denaturierungs-Temperatur" stabil ist. Diese Vorstellung berücksichtigt aber auch, daß jeder der beiden Zustände nur das makroskopische Phänomen aus der Summe der Eigenschaften ist, die durch viele mikroskopische Zustände gebildet werden, welche dem Protein bei einer gegebenen Temperatur, Druck usw. möglich sind. Voraussetzung für diese Betrachtungsweise ist eine hohe Stabilität der dreidimensionalen Struktur, das Molekül muß also stabiler sein als gewöhnliche synthetische Polymere (3). Diese hohe Stabilität wird durch starke intramolekulare Kräfte bedingt. Andererseits setzt eine scharf begrenzte temperaturbedingte Strukturänderung einen hohen Grad von Kooperativität voraus, die kooperative Einheit ist dabei fast gleichbedeutend mit dem gesamten starren Molekül.

Eine andere Betrachtungsmöglichkeit ist die Aufteilung des Denaturierungsvorganges in mehrere Zwischenzustände, d. h. daß thermodynamisch stabile Zwischenstufen existieren (Zusammenfassung bei CH. TANFORD (4)). Obgleich bisher solche Zwischenstufen bezüglich ihrer Raumstruktur, ihrer kinetischen Eigenschaften usw., noch nicht erfaßt werden konnten, deuten doch Meßergebnisse, besonders an Staphylococcus-Nuclease (5, 6), die nach dem 2-Stufen-Mechanismus nicht interpretierbar sind, auf deren Existenz hin. Auch führt uns die Überlegung zu diesem Mechanismus, daß in einem Protein wegen seines inhomogenen Aufbaues verschiedene Teile des Makromoleküls sich bei unterschiedlichen Temperaturen strukturell umlagern, was insgesamt gesehen einer stufenweisen Denaturierung entspricht. Dabei hat jede Stufe kooperative Einheiten, die aber nur einzelnen Enzymbereichen entsprechen.

1.2. Ribonuclease als "Pionier-Enzym"

RNase war in fast jeder Hinsicht das prädestinierte Enzym, an dem neue Methoden erprobt und fundamentale Erkenntnisse gewonnen wurden. So war es das erste Ferment und nach Insulin das zweite Protein überhaupt, dessen Primärstruktur aufgeklärt werden konnte. Für diese hervorragende Leistung und für die Aufdeckung des Zusammenhanges zwischen chemischer Struktur und enzymatischer Wirkung bei RNase, wurden C. B. ANFINSSEN, S. MOORE

und W.H. STEIN 1972 sogar mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Ein weiterer Markstein der Enzymforschung war die Aufklärung der Tertiärstruktur von RNase.

Bisher letzter Höhepunkt der Forschungen an RNase war, als es nach Vorarbeiten von HOFMANN (7) sowohl GUTTE und MERRIFIELD (8) als auch HIRSCHMANN et al. (9) im Jahre 1969 gelang, auf zwei verschiedenen Wegen das erste vollsynthetische Enzym mit der Primärstruktur der RNase A bzw. des S-Proteins der RNase (also die Sequenz von Aminosäuren 21 bis 124) zu erhalten. Dieses weist mit dem nativen Protein bzw. S-Peptid bezüglich der Spezifität völlige Übereinstimmung auf. Die Aktivität des synthetischen Produktes betrug jedoch nur ca. 20 % der natürlich vorkommenden RNase A.

Seit etwa 1962 wurde RNase in immer stärkerem Maße zum Studium des Denaturierungsvorganges herangezogen, so daß heute über dieses Enzym insgesamt mehr Informationen zur Verfügung stehen, als über irgend ein anderes Protein mit enzymatischer Wirkung.

1.3. Ergebnisse der Denaturierungsuntersuchungen an Ribonuclease

Zunächst seien hier die wichtigsten Methoden erwähnt, mit denen bisher bei RNase der Denaturierungsvorgang untersucht wurde: Paramagnetische Resonanz (10), optische Rotations-Dispersion (11, 12), Kalorimetrie (13 - 18), Temperatur- und pH-Sprung (19 - 21), Viskosität (22 - 24, 11), UV-Absorption (11, 20, 21, 25 - 29), mittels proteolytischer Enzyme (15, 30), Zirkular-Dichroismus (31, 32) und elektronen-paramagnetische Resonanz (10).

Speziell hervorzuheben ist die Methode der kernmagnetischen Resonanzmessung (allgemein (33), speziell RNase (34 - 44)). Da das Resonanzsignal von der räumlichen Umgebung des jeweiligen Atoms abhängt, können somit geringste Änderungen der Positionen der Nachbaratome festgestellt werden. Die Methode wäre daher zur Erforschung des Denaturierungsvorganges sehr gut geeignet, da damit bereits kleinste Abweichungen vom 2-Stufen-Mechanismus erfaßbar sein sollten. Leider ist jedoch das erhaltene Spektrum wegen des relativ hohen Molekulargewichtes von RNase (13800)

so reich an Peaks, daß bisher nur einige derselben speziellen Protonen von bestimmten Aminosäuren im RNase-Molekül zugeordnet werden konnten. Vor allem sind dies die Protonen der Imidazolringe der vier Histidinreste. Auf diese Weise konnten von den Histidinen die wahren Titrationskurven erstellt sowie auch die Abhängigkeit der vier pK-Werte von der Temperatur ermittelt werden (siehe Diskussion und Tabelle 3 b).

Als Denaturierungsmittel wird hauptsächlich die Wasserstoffionen-Konzentration, Harnstoff (z. B. 35, 45), Guanidin (z. B. 34) und die Temperatur (10, 14, 28, 30, 31, 36 - 39, 41, 42, 44) eingesetzt. Gemeinsam ist fast allen diesen Arbeiten, daß sie im sauren Milieu durchgeführt wurden, in dem die Stabilität von RNase relativ gering, die Reversibilität der Denaturierung jedoch groß ist (46). Im Bereich der größten Aktivität (pH 7,2) wurde das Enzym jedoch nur selten auf eventuelle Zwischenstufen der thermischen Denaturierung untersucht. Ebenso suchte man derartige Zwischenstufen erstaunlicherweise bisher nur durch Messung der oben angegebenen physikalischen Enzymeigenschaften und deren Veränderungen zu erfassen. Die charakteristische Eigenschaft von RNase, nämlich Ribonucleinsäure bzw. spezielle künstliche Substrate zu spalten, wurde zur Lösung dieses Problems noch nicht eingesetzt, obwohl doch bei Enzymen eine sehr enge Beziehung zwischen Struktur und Aktivität besteht.

Bei Durchsicht der Literatur läßt sich aus der Menge der vorliegenden Ergebnisse anderer Autoren trotzdem noch nicht eindeutig sagen, ob bei der Denaturierung von RNase Zwischenstufen auftreten und wie stabil diese sind; man kann jedoch feststellen, daß die Mehrzahl der Untersuchungen auf deren Existenz hindeutet. Zwar lassen sich manche Versuche mit dem 2-Stufen-Vorgang erklären (12, 22, 47), andere, meist neuere, legen die Annahme von Zwischenstufen bzw. Isomerisierungen nahe (21, 25, 28, 30, 31, 45, 46, 48). Nähere Angaben über die Anzahl der bei der Denaturierung anscheinend durchlaufenen Zwischenstufen wurden von C. C. BIGELOW gemacht (11). Er fand in acht verschiedenen Denaturantien unter Veränderung weiterer Variabler (pH, Temperatur, Konzentration) vier verschiedene, teilweise oder ganz denaturierte Enzymspezies. BENZ und ROBERTS (49) stellten mit Guanidin als Denaturans (pH 5,5; 33° C) zwei Zwischenstufen fest.

Da die bisherigen Arbeiten von sehr unterschiedlichen Variablen (pH, Temperatur, Denaturans, Ionenstärke) und Untersuchungsmethoden ausgehen, erscheint es noch verfrüht, sich ausschließlich auf eine der beiden Alternativen festzulegen, zumal einige Arbeitskreise beide Wege am gleichen Enzym für wahrscheinlich halten. So hängt der Entfaltungsmodus nach BRADBURY und KING vom jeweiligen Denaturans ab (35), TSONG und Mitarbeiter (14, 20, 21) diskutieren eine pH-Abhängigkeit dafür. Mit letzterer Ansicht, daß nämlich unterhalb von ca. pH 2 ein Zweistufenmechanismus, oberhalb davon Zwischenstufen vorherrschend seien, sind oben angegebene frühere Denaturierungsversuche anderer Forscher (12, 21, 22, 31, 46, 47) gut in Übereinstimmung zu bringen.

In manchen Arbeiten, die die thermische Denaturierung von RNase behandeln, werden auch genauere Temperaturen (oder Temperaturbereiche) angegeben, in denen das Enzym eine Strukturveränderung erfahren soll. Tabelle 1 gibt einen Überblick. Es wurde darin jedoch die bei ca. 60° C ablaufende vollständige Denaturierung von RNase nicht berücksichtigt. Aus den aufgeführten Arbeiten gehen aber keine genauen Angaben über den Prozeß der zugrunde liegenden Strukturänderung hervor; bei den NMR-Messungen beziehen sich die angegebenen Temperaturen jedoch zumeist auf Irregularitäten der pK-Werte bestimmter Histidin-Reste. Die anscheinend regellose Verteilung der Übergangstemperaturen führte ZABORSKY (38) zu der Folgerung, daß diese von den experimentellen Bedingungen der angewandten physikalischen Meßmethode und von den speziell beobachteten Aminosäureresten der RNase abhängig seien.

2. Problemstellung

Aus den geschilderten Diskrepanzen läßt sich folgern, daß man auf der Suche nach Zwischenstufen beim Enzym RNase Meßbedingungen wählen sollte, bei denen die Zahl der möglichen Variablen weitgehend reduziert ist. Dies besagt, daß die Strukturveränderung allein durch die Temperatur und nicht noch zusätzlich durch denaturierende Reagentien bewirkt werden sollte. Auch sollten etwaige stabilisierende oder destabilisierende Salzeinflüsse dadurch ausgeschlossen werden, daß man ohne Salz- bzw. Pufferzusätze arbeitet. Diese Bedingungen werden erfüllt, wenn man das von TALSKY und MÜLLER (50) bei RNase angegebene Verfahren wählt. Hierbei wird in salzfreiem, ungepuffertem Medium bei frei vorgebbarem pH-Wert die Hydrolysegeschwindigkeit von C₁p durch RNase bei beliebigen Temperaturen titrimetrisch verfolgt (pH-stat-Methode). Die Ergebnisse dieser Meßmethode zeigen durch Abweichungen von einer Geraden im ARRHENIUS-Diagramm, welche Auswirkungen etwaige Strukturänderungen auf das enzymatische Verhalten von RNase haben. Diesem Gesichtspunkt wurde bisher noch keine Beachtung geschenkt. Dies ist um so erstaunlicher, als bereits bei vielen anderen Enzymen derartiges anormales Verhalten ("Knickpunkt" im ARRHENIUS-Diagramm) Strukturänderungen bei bestimmten Temperaturen nahelegt (Zusammenfassung bei TALSKY (51)). Auch sind derartige Unstetigkeitsstellen für RNase bereits bekannt (50). Es soll daher in Fortführung dieser Arbeit hier untersucht werden, wie die bei tiefen Temperaturen gefundene Anomalie der enzymatischen Aktivität durch Veränderung des pH-Wertes beeinflußt wird und ob aus diesem pH-Einfluß Rückschlüsse auf den dafür verantwortlichen Enzymbereich gezogen werden können.

3. Durchgeführte Messungen

3.1. Ansatz und Auswertung der Messungen

Bei der Durchführung der Messungen diente der in (50) erwähnte Titrator (pH-stat-Gerät) zur Aufzeichnung der Zeit-Umsatz-Kurven; als Substrat wurde C:p verwendet, da dieses in großer Reinheit leicht erhältlich ist. Außerdem bietet dieses Substrat gegenüber RNS den Vorteil, daß die Ring-spaltung die einzige enzymatische und auch direkt titrimetrisch erfaßbare Reaktion ist, welche während der Messung abläuft, während bei RNS als Substrat der vorgelagerte Ringschluß titrimetrisch nicht erfaßbar ist.

Die einzelnen Titrationskurven wurden - bis auf die Temperatur und den vorgegebenen pH-Wert der Reaktionslösung - unter möglichst identischen Bedingungen gewonnen; d. h. der zeitliche Ablauf der einzelnen Arbeitsschritte wurde mittels Stoppuhr genauestens gleichgehalten. Die Auswertung der durch Produkthemmung gekrümmten Zeit-Umsatz-Kurven erfolgte auf zwei verschiedenen Wegen: Entweder wurde ein geeignetes Kurvenlineal (geschnitten nach Prof. EMDE) der Kurve weitgehendst angeglichen und daran im Zeitpunkt der Enzymzugabe die Tangente gezogen, deren Steigung der Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion entspricht. Andernfalls wurde nach (52) auf die Anfangsgeschwindigkeit zurückgerechnet (zu einem kritischen Vergleich dieser beiden Methoden siehe (53)). Die so erhaltenen Ergebnisse stimmen sehr gut überein. Bei jeder Temperatureinstellung wurden mindestens zwei Bestimmungen durchgeführt. Die Abhängigkeit der mittleren Streubreite dieser Mehrfachbestimmungen (siehe Fußnote) vom jeweiligen pH-Wert der Meßreihe zeigt Tabelle 2. Aus ihr kann man entnehmen, daß

Die mittlere Streubreite einer jeden Meßreihe (pH, c_{RNase} und c_{Substrat} jeweils gleich, T variabel) wurde auf folgende Weise ermittelt: Es wurde bei gleicher Temperatur der Mittelwert der erhaltenen Anfangsgeschwindigkeiten bestimmt und sodann die prozentuale Abweichung der einzelnen Anfangsgeschwindigkeiten von diesem Mittelwert errechnet. Die mittlere Streubreite ergibt sich dann aus der Summe der einzelnen prozentualen Abweichungen geteilt durch die Anzahl der Meßpunkte.

die Fehlerbreite im Bereich um pH 7,7 am kleinsten ist und daß sie mit steigender Substratkonzentration abnimmt (Nr. 5 ... 9). Weiterhin stellten wir fest, daß auch mit steigender Temperatur die Fehlerbreite kleiner wird.

3.2.1. Abhängigkeit der Bruttoreaktionsgeschwindigkeit v_{br} von T und pH

Wie aus Tabelle 2 zu sehen ist, überstreicht jede ARRHENIUS-Kurve einen Temperaturbereich von ca. 3 ... 27° C, wobei die einzelnen Meßpunkte ca. 2 grd auseinanderliegen. Abb. 1 zeigt drei derartige Auftragungen von $\lg v_{br}/1/T$. Aus ihnen ist ersichtlich, daß bei konstanter Temperatur die Bruttoreaktionsgeschwindigkeit stark vom jeweiligen pH-Wert abhängig ist. Weiterhin erkennt man, daß sich jede Kurve in zwei Geraden und einen Übergangsbereich aufgliedern läßt. Legt man die Temperaturintervalle enger (unter 1,5 grd), so zeigt der Übergangsbereich einen reproduzierbaren Wellenzug, dessen Wendepunkt gut angebbar ist (50). Jedoch auch ohne derartig kleine Temperaturschritte läßt sich der Wendepunkt, wie aus Abb. 1 ersichtlich, mit hinreichender Genauigkeit angeben. Die für den Wendepunkt ermittelten Temperaturen (T_m) sind ebenfalls in Tabelle 2 für die entsprechenden pH-Werte eingetragen.

Die Angaben der Fehlerbreite der Wendepunkte (T_m) wurden festgelegt als die Grenzen, bei denen der Kurvenverlauf bereits wieder sicher linear im ARRHENIUS-Diagramm ist. Sie umfassen also den gesamten Übergangsbereich.

Die Blindverseifung von C:p wurde im Bereich von pH 6,3 ... 8,3 bei Temperaturen zwischen ca. 3° C und 27° C ebenfalls bestimmt. Sie kann jedoch vernachlässigt werden, da sie unter 2 % der enzymatischen Hydrolysegeschwindigkeit liegt. Lediglich bei pH 8,3 wurde die Blindverseifung berücksichtigt, da ihr Wert hier 3,1 % der Anfangsgeschwindigkeit erreicht.

Aus den ARRHENIUS-Diagrammen wurden schließlich auch die Aktivierungsenergien für die gesamte ablaufende Reaktion entnommen. Für jede Meßreihe erhielt man zwei Werte; dabei bezeichnet $E_{exp,1}$ die Aktivierungsenergie, die dem geraden Teilstück unterhalb der Übergangstemperatur T_m ,

$E_{\text{exp}, 2}$ diejenige oberhalb T_m entspricht.

3.2.2. Auswertung der Meßergebnisse

3.2.2.1. pH-Optimum bei verschiedenen Temperaturen

Zunächst wurde versucht, bei verschiedenen Temperaturen das jeweilige pH-Optimum der Hydrolyse von C:p durch RNase zu ermitteln, indem wir aus allen ARRHENIUS-Kurven für die jeweilige Temperatur den Wert v_{br} entnahmen und diesen gegen den pH-Wert der betreffenden ARRHENIUS-Kurve auftrugen. Es wurden jedoch zwei verschiedene Chargen von Substrat verwendet (Bio Research und Merck), auch schwankten die jeweiligen Einwaagen an Substrat im Mittel um $\pm 1,15\%$ um den Mittelwert von $3,816 \text{ mg/ml}$. Dies bewirkt eine deutliche Unschärfe der pH-Optimumkurve, da nicht in Substratsättigung gearbeitet wurde (50). Weiters ist für diesen Zweck die bei pH 6,28 erhaltene ARRHENIUS-Kurve unbrauchbar, da hier die Substratsättigung um 21% zu tief liegt gegenüber den anderen Kurven. Aus diesen Gründen konnte lediglich ermittelt werden, daß die Verschiebung des pH-Optimums durch die Temperatur geringer sein muß als die erwähnte Fehlerbreite ihrer Bestimmung, falls eine derartige Temperaturabhängigkeit überhaupt vorliegt. Auch die Breite des Optimums selbst von ca. $0,4 \text{ pH-Einheiten}$ macht die Ermittlung einer geringen temperaturbedingten Verschiebung fast unmöglich. In Übereinstimmung mit anderen Forschern (54 - 57) fanden wir das Optimum bei Temperaturen von 5° C bis 18° C bei ca. pH 7,2 (siehe auch 58).

3.2.2.2. Abhängigkeit der mittleren Temperatur T_m der Unstetigkeitsstelle vom pH-Wert

Trägt man in einem Diagramm den Mittelpunkt der Unstetigkeitsstelle (T_m , siehe Tabelle 2) gegen den zugehörigen pH-Wert auf, so erhält man den in Abb. 2 gezeigten Kurvenverlauf. In dieses Diagramm wurden auch die beiden bereits früher gefundenen Werte: pH 6,5 : $T_m = 6,95^\circ \text{ C}$ und

pH 7,2 : $T_m = 11,2^\circ \text{C}$ mit aufgenommen (50), die sich sehr gut in den erhaltenen Kurvenverlauf einfügen. Im pH-Bereich zwischen pH 6,3 und 8,3 zeigen die Ergebnisse, daß sich der Mittelpunkt T_m des Unstetigkeitsbereiches von 7°C nach 14°C verschiebt. Dabei bildet sich eine S-förmige Kurve mit einem Wendepunkt bei pH 7,1 und $T_m = 10,5^\circ \text{C}$, welche bei Doppelbestimmungen gut reproduzierbar ist. Es scheint, als ob der Kurvenverlauf jedoch nicht zum Wendepunkt symmetrisch ist, sondern bei darüber liegenden pH-Werten eine schwächere Krümmung aufweist als bei darunter liegenden.

Zur weiteren Sicherung des S-förmigen Kurvenverlaufes wäre es angebracht gewesen, diesen auch unter pH 6,3 und über pH 8,3 zu verfolgen um festzustellen, ob sich in diesen Bereichen T_m noch ändert oder konstant bleibt. Dem stehen jedoch zwei gravierende Hindernisse entgegen. Die angewandte titrimetrische pH-stat-Methode erfaßt nämlich den Reaktionsablauf dadurch, daß der durch RNase aus dem cyclischen Substrat freigesetzte Phosphorsäuremonoester titriert wird. Dies setzt aber voraus, daß man diesen möglichst vollständig erfassen kann, d. h., daß der Titrationspunkt genügend weit vom 2. pK-Wert des gebildeten Phosphorsäureesters entfernt liegt; letzterer beträgt ca. pK 6,0 (59 - 62). Bei pH 6,3 sind somit nur ca. 70 % des gebildeten Produktes titrimetrisch erfaßbar. Da jedoch der pK-Wert von der Temperatur fast unabhängig ist (60), hat die zu geringe Erfassbarkeit weder Einfluß auf die Steigung der ARRHENIUS-Kurve noch auf T_m ; bei noch tieferen pH-Werten ist jedoch die Sicherheit dieser Aussage nicht mehr gewährleistet. Unabhängig davon kann man aus Tabelle 2 entnehmen, daß auch die Fehlerbreite bei niedrigen pH-Werten wegen der geringen Reaktionsgeschwindigkeit ansteigt. Dies ist auch der Fall bei pH-Werten über 8,0. Hier kommt jedoch erschwerend hinzu, daß sich die Blindverseifung des Substrates durch alkalische Hydrolyse immer störender bemerkbar macht. Somit mußten die Messungen auf den oben angegebenen pH-Bereich beschränkt bleiben.

3.2.3. Temperaturabhängigkeit der Konstanten K_m und $V_{\max}$ —

Trotz des großen Forschungsmaterials über RNase sind Daten über die

Temperaturabhängigkeit von K_m (= Dissoziationskonstante des ES-Komplexes) oder $V_{\max}$ recht spärlich. So ermittelten ERMAN und HAMMES (63) spektroskopisch bei pH 6,0 und $I = 0,15$ für K_m folgende Werte: 15°C : $K_m = 0,19 \text{ [mMol/l]}$ und 25°C : $K_m = 1,10 \text{ [mMol/l]}$. Eine in früheren eigenen Untersuchungen aufgenommene Abhängigkeit zwischen K_m und der Temperatur bei pH 6,5 ist in (50) zu finden. Dabei wurde festgestellt, daß die im ARRHENIUS-Diagramm auftretende Unstetigkeit bei gleicher Temperatur auch im Diagramm $\lg K_m$ versus $1/T$ zu finden ist. Es sollte hier geprüft werden, ob diese Übereinstimmung ein Sonderfall für pH 6,5 ist, oder ob die Unstetigkeitsstelle von K_m generell bei gleicher Temperatur liegt wie bei v_{br} . Dazu wählten wir den pH-Wert von 7,15, bei dem die Fehlerbreite der Meßreihen klein ist, der im Wendepunkt der S-förmigen Kurve liegt und auch von dem bereits ermittelten Punkt pH 6,5 genügend weit entfernt ist. Die eingesetzten fünf verschiedenen Substratmengen sind in Tabelle 2 verzeichnet, (sie liegen zwischen 1,024 und 9,424 mg/ml), der Temperaturbereich liegt bei jeder ARRHENIUS-Kurve zwischen $3,2$ und $21,2^\circ \text{C}$ und wurde in 8 Meßpunkte aufgeteilt, zwischen denen also eine Temperaturdifferenz von ca. $2,6$ grad liegt. Die erhaltene Schar von 8 MICHAELIS-Kurven mit T als drittem Parameter wurde in ein LINEWEAVER-BURK-Diagramm umgezeichnet. Daraus erhält man die in Abb. 3 gegen $1/T$ eingetragenen Werte für K_m : Deutlich erkennt man auch in dieser Darstellung eine Unstetigkeit bei $11,1^\circ \text{C}$, somit bei gleicher Temperatur wie in der Auftragung von $\lg v_{br}$ versus $1/T$, sie stimmt mit der nach Abb. 2 für pH 7,15 zu erwartenden Temperatur $T_m = 10,2^\circ \text{C}$ sehr gut überein. Die beiden daran angrenzenden Linearbereiche weisen ΔH -Werte von ca. 8,28 und 3,04 kcal/Mol auf.

Die für 2 verschiedene Temperaturen ebenfalls aus dem LINEWEAVER-BURK-Diagramm entnommenen Werte für $V_{\max}$ sind in Abb. 4 logarithmisch gegen $1/T$ aufgetragen. Übereinstimmend mit WITZEL et al. (64) und (50) wurde festgestellt, daß die Abreaktionsgeschwindigkeit des ES-Komplexes, die durch k_{+2} ($= V_{\max} / [\text{Enzym}]$) beschrieben werden soll, keine Unstetigkeit in ihrem Temperaturverhalten aufweist, sondern mit steigender Temperatur nur stetig zunimmt. Dennoch ergibt die Auftragung keine exakte Gerade, sondern weist eine leichte konvexe Krümmung auf.

3.2.4. Abhängigkeit der experimentellen Aktivierungsenergie E_{exp} vom pH-Wert

Die recht genau angebbaren experimentellen Aktivierungsenergien sind sowohl für den linearen Bereich unterhalb $T_m(E_{\text{exp},1})$ als auch für den linearen Bereich oberhalb $T_m(E_{\text{exp},2})$ für jede ARRHENIUS-Kurve in Tabelle 2 aufgeführt. In Abb. 5 sind diese Aktivierungsenergien gegen den zugehörigen pH-Wert aufgetragen. Drei Besonderheiten lassen sich daraus entnehmen: Bis auf wenige Unregelmäßigkeiten bei den niedrigen pH-Werten sinkt die experimentelle Aktivierungsenergie ab und zwar bei $E_{\text{exp},1}$ pro steigenden pH-Wert um 10,0 kcal/Mol. Um den gleichen Wert von 10,0 kcal/Mol pro pH-Einheit sinkt auch $E_{\text{exp},2}$ bei steigendem pH-Wert. Das bedeutet, daß sich $E_{\text{exp},1}$ und $E_{\text{exp},2}$ in jeder ARRHENIUS-Kurve um den gleichen Betrag unterscheiden, nämlich um durchschnittlich 4,3 kcal/Mol; mit anderen Worten, die im Linearbereich unterhalb der Unstetigkeitsstelle T_m ermittelte Aktivierungsenergie ist bei Temperaturen oberhalb derselben um 4,3 kcal/Mol vermindert: $E_{\text{exp},1} - E_{\text{exp},2} \approx 4,3$ kcal/Mol. Schließlich stellten wir bei pH 7,15 noch fest, daß mit steigender Substratkonzentration die experimentelle Aktivierungsenergie ansteigt, wobei sie einem Grenzwert zustreben scheint.

4. Diskussion der Ergebnisse

4.1. Durch welchen Reaktionsschritt wird die Unstetigkeit bedingt?

Wie in der Problemstellung bereits erwähnt, sind Unstetigkeiten im ARRHENIUS-Diagramm in der Literatur schon vielfach beschrieben worden. Sie werden meist durch eine der folgenden Ursachen erklärt (65):

- a) Zwei parallele enzymatische Reaktionen, z. B. über zwei verschiedene Aktive Zentren, mit unterschiedlichen Temperatur-Koeffizienten;
- b) der gesamte katalytische Vorgang besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten mit unterschiedlichen Temperaturkoeffizienten;
- c) das Enzym kann in einem begrenzten Temperaturbereich zwei unterschiedliche Konformationen annehmen, die miteinander im Gleichgewicht stehen, beide etwa gleich aktiv sind, jedoch unterschiedliche Aktivierungsenergien besitzen.

Auf Grund unserer Untersuchungen über das Temperaturverhalten der enzymatischen Aktivität von Ribonuclease bei pH 6,5 kamen wir zu dem Ergebnis (50), daß es sich in unserem System um einen Umlagerungseffekt des Enzymmoleküls in eine andere Konformation (gemäß Ansicht c) handelt. Diese Umwandlung erfolgt nicht in einem Knickpunkt, in dem sich die unterschiedlichen linearen Bereiche (entsprechend den zwei verschiedenen Aktivierungsenergien) der beiden Enzymkonformationen im ARRHENIUS-Diagramm schneiden, sondern es bildet sich ein Übergangsbereich von ca. 3 ... 4 grd Breite und wellenförmigem Verlauf heraus. In diesem Bereich stehen beide Konformationen miteinander im Gleichgewicht; bei der Temperatur T_m ist jede Konformation in gleicher Menge vorhanden. Durch eine dementsprechende Formel läßt sich der Verlauf im ARRHENIUS-Diagramm genau beschreiben. Ein analoges Verhalten wurde für Pyruvat-Kinase gefunden (66), bei der durch eine analoge Berechnung die Umwandlung zweier aktiver Konformationen mit unterschiedlicher Aktivierungsenergie ineinander wahrscheinlich gemacht werden konnte; eine Auflösung

des Übergangsbereiches in einen Kurvenzug gelang jedoch nicht, auch konnte die Konformationsänderung nicht auf molekularer Basis erläutert werden. Auch ein ähnliches Verhalten von Myosin konnte nur generell als Konformationsänderung gedeutet werden (67).

Wir können aus dem Gesagten zwei Schlüsse ziehen: Ein Enzymmolekül ist auf Grund seines hohen Molekulargewichtes (RNase: 13800) relativ flexibel; dabei gibt es viele verschiedene Konfigurationsmöglichkeiten, von denen einige bevorzugt sind; diese bevorzugten Konformationen sind je nach Milieu-Bedingungen verschieden, also eine Funktion von z. B. zugesetzter Harnstoffmenge, pH-Wert, Temperatur usw., jedoch enzymatisch aktiv. So konnte z. B. BARNARD (45) eine noch aktive, jedoch bereits durch Harnstoffzusatz teildenaturierte Ribonucleaseform nachweisen. Zum zweiten müssen sich die Konformationsänderungen auf das katalytische Geschehen auswirken; sei es dadurch, daß die Umlagerung direkt im aktiven Zentrum stattfindet, während das übrige Enzymmolekül unverändert bleibt, oder, daß eine Umlagerung entfernt vom katalytischen Zentrum stattfindet und nur durch Fernwirkung (sterisch, elektrostatisch) auf dieses einwirkt. Die Veränderung in der Konformation wird somit in der Kinetik der katalysierten Reaktion wiedergespiegelt.

Diese Auswirkungen wurden genauer untersucht, indem das Temperaturverhalten einiger kinetischer Parameter bei pH 6,5 bestimmt wurde (50). Dabei konnte, wie schon erwähnt, festgestellt werden, daß auch das Temperaturverhalten von K_m und K_p (= Gleichgewichtskonstante des Enzym-Produkt-Komplexes) eine Unstetigkeit bei gleicher Temperatur wie v_{br} zeigt, während k_{+2} , die Abreaktionskonstante des ES-Komplexes zu Enzym und Produkt, stetig und linear verläuft. Gleiches Verhalten ergab sich, wie oben gezeigt wurde, auch bei pH 7,15. Aus der bei zwei verschiedenen pH-Werten gefundenen Übereinstimmung kann man annehmen, daß die im $\lg v_{br}/1/T$ -Diagramm festgestellten Unregelmäßigkeiten bei jedem anderen pH-Wert ebenfalls auf Unregelmäßigkeiten von K_m in Abhängigkeit von der Temperatur zurückgeführt werden können. Die vorerst nur für pH 6,5 getroffene Folgerung (50), daß nämlich die Unstetigkeit bedingt ist durch eine in engem Temperaturbereich ablaufende Enzymumlagerung, die den Anlagerungsvorgang des Substrates (ausgedrückt durch K_m) beeinflusst,

nicht aber die Abreaktion des ES-Komplexes, kann somit auf einen größeren pH-Bereich erweitert werden.

Zu ähnlichen Überlegungen kommen V.L. ANTONOVSKII und YU. V. SHURUKHIM (68), die mit U:p als Substrat im Bereich von pH 4 ... 9 ebenfalls Unstetigkeiten im Temperaturverlauf kinetischer Parameter nachwiesen, die sie ebenfalls als Konformationsänderung ohne Denaturierung auffaßten. Der Grund hierfür liegt ihrer Ansicht nach in einer sterischen Veränderung des Aktiven Zentrums des Enzyms, die die Substratbindung beeinflusst, während die Abreaktion des Enzym-Substrat-Komplexes in Übereinstimmung mit eigenen Ergebnissen davon nicht betroffen ist. Die Abweichung der angegebenen Umlagerungstemperatur (30 ... 35° C) von der von uns gefundenen läßt sich dadurch erklären, daß das RNase-Molekül mehrere Umlagerungen durchläuft, von denen auch wir bei pH 7,2 eine bei ca. 28° C fanden (53).

Einen Hinweis auf die Art der Veränderung bei der Anlagerung des Substrates an das Enzym liefert uns vielleicht die konstante Differenz von $E_{\text{exp},1}$ und $E_{\text{exp},2}$. Da ihr Wert über fast den gesamten vermessenen pH-Bereich gleichbleibend ca. 4,3 kcal/Mol beträgt (siehe Abb. 5), legt dies die Annahme nahe, daß bei Temperaturen unterhalb des Unstetigkeitspunktes zur Anlagerung des Substrates eine H-Brücke mehr im Enzym gelöst werden muß bzw. eine weniger ausgebildet wird als oberhalb dieses Punktes, denn die Bindungsenergie einer Wasserstoff-Brücke liegt bei ca. 3 ... 6 kcal/Mol.

Aus der Gegenüberstellung des aus (50) gefundenen ΔH -Wertes für K_m von 6,98 kcal/Mol unterhalb 21° C bei pH 6,5 und des hier bei pH 7,15 gefundenen ΔH -Wertes von 3,04 kcal/Mol oberhalb 11° C kann man ableiten, daß mit steigendem pH-Wert der ΔH -Wert von K_m stark abnimmt. Anders ausgedrückt bedeutet das, mit steigendem pH-Wert wird die MICHAELIS-Konstante weniger endotherm (eventuell bei genügend hohen pH-Werten sogar exotherm). Damit kann auch erklärt werden, warum ERMAN und HAMMES (63) bei pH 6,0 eine so starke Temperaturabhängigkeit von K_m fanden.

4.2. In welchem Enzymbereich läuft die Umlagerung ab?

Nachdem durch die oben angeführten Ergebnisse eine temperaturinduzierte Enzymumlagerung als Grund für die gefundenen Unstetigkeiten angenommen werden kann, erhebt sich die Frage nach dem genaueren Bereich, in dem diese stattfindet, bzw. welche Aminosäuren daran beteiligt sind. Diese Aminosäuren müssen den katalytischen Prozeß entweder direkt beeinflussen, indem sie einen Teil des aktiven Zentrums darstellen, oder es muß durch sterische Weiterleitung bei ihrer Umlagerung die räumliche Anordnung des aktiven Zentrums beeinflusst werden. Dabei darf die Aktivität des Enzyms nicht wesentlich verändert werden. Letztere Bedingung kann durchaus erfüllt werden, da sogar teilhydrolysierte bzw. reduzierte RNase noch volle Aktivität haben kann (z. B. RNase S (= äquimolekulare Mischung von RNase-Peptid und -Protein), oder 15, 69).

Betrachtet man das aktive Zentrum der RNase, so sind für die katalytische Wirkung speziell drei Aminosäuren wichtig, nämlich Histidin 12, Histidin 119 und Lysin 41 (70 - 73). Die Aktivität von RNase ist der räumlichen Nähe dieser drei Aminosäuren zuzuschreiben; wird ihre Anordnung geringfügig verändert, äußert sich das in veränderten kinetischen Konstanten der katalysierten Reaktion.

Um Aussagen über die Eigenschaften derjenigen Aminosäure zu gewinnen, deren Umlagerung die Anomalie bewirkt, nahmen wir eine pH-Abhängigkeit von T_m der Anomalie auf. Die dazu vermessenen ARRHENIUS-Kurven sind in Tabelle 2 aufgeführt, die Mittelpunkte der Anomalien T_m sind in Abb. 2 gegen den pH-Wert aufgetragen, bei dem sie gewonnen wurden. Es erscheint zunächst wenig verwunderlich, daß bei tiefem pH-Wert die Anomalie bei niedrigerer Temperatur gefunden wird als bei hohem pH-Wert. Man könnte darin eine Analogie zur thermischen Denaturierung (ca. 60° C) von RNase sehen, bei der der gleiche Effekt auftritt: durch eine größere Instabilität wird RNase im sauren Milieu bei tieferen Temperaturen denaturiert als im neutralen Bereich (3, 14). Erstaunlich ist jedoch demgegenüber die Form der Abhängigkeit für T_m von pH: die Kurve zeigt einen ausgesprochenen S-förmigen Verlauf mit einem Wendepunkt bei pH 7,1 und einer Breite von nur 1,5 pH-Einheiten, wenn man den weiteren Verlauf

unterhalb pH 6,3 und oberhalb pH 8,3 als linear annimmt. Diesen Unterschied kann man so erklären, daß bei der thermischen Denaturierung von RNase in wäßriger Lösung die Veränderung physikalischer Parameter bzw. das Erlöschen der enzymatischen Aktivität betrachtet wird, deren Ursache in einer Auffaltung des Enzyms mit all seinen prostetischen Gruppen zu suchen ist, während in unserem Falle die geringe Veränderung nur einer bzw. weniger Gruppen indirekt mittels der enzymatischen Aktivität verfolgt wird.

Aus dem Verlauf der Kurve folgerten wir, daß sie eine "Titrationskurve" derjenigen Aminosäure sein kann, durch die die Anomalie bedingt wird. Dies würde besagen, daß die betreffende Aminosäure einen pK-Wert von 7,1 hätte und im undissoziierten Zustand (unterhalb pH 6,5) sich bei 6,9° C umlagert, während sie sich in dissoziierter Form (oberhalb pH 7,9) erst bei 14° C umlagert. Diese Stabilisierung der dissoziierten Form kann durch die Ausbildung von intramolekularen Ionenbeziehungen bewirkt sein.

Um eine Vorentscheidung der in Betracht kommenden, in RNase enthaltenen Aminosäuren mit polarem Rest zu ermöglichen, beziehen wir uns auf Tabelle 3, in der die meisten der bisher ermittelten pK-Werte polarer Aminosäuren von RNase zusammengestellt sind. Die pK-Werte der Tyrosine wurden mittels LASER-RAMAN-Spektroskopie (74) oder photometrisch (75) erhalten, sämtliche anderen mittels NMR-Messungen. Auffallend an der Tabelle ist zunächst, daß fast ausschließlich die vier Histidine untersucht wurden; dies unternahm man, um Einblick in den "Mechanismus" der Enzymwirkung zu erhalten (His 12 und His 119 gehören zum aktiven Zentrum), zum anderen kann die hochauflösende NMR-Spektroskopie über Nachbarschaftsbeziehungen gerade der Histidine in einem Proteinmolekül detaillierte Informationen liefern, da die Imidazolring-C(2)-Protonen von den Resonanzen anderer Protonen wegen ihrer besonderen chemischen Verschiebung gut unterschieden werden können (76). Diese Protonen können auch untereinander gut getrennt werden, wenn ein Protein mehrere Histidine enthält, da die räumliche Faltung des Proteins jeweils unterschiedliche Umgebungen schafft. Darüber hinaus verändern sich die Werte der chemischen Verschiebung dieser Resonanzen kontinuierlich mit dem Grad der Protonisierung des Imidazol-Ringes, so daß die einzelnen Ionisationskonstanten

der Histidin-Reste durch ihre NMR-Titrationskurven bestimmt werden können (z. B. 77, 78).

Will man die gefundene "Unstetigkeit-Titrationskurve" einer Aminosäuregruppe oder gar einer bestimmten Aminosäure zuordnen, so darf man sich wohl speziell den Histidinen zuwenden, da der Wendepunkt $pK_{a,T}$ der S-förmigen Kurve bei pH 7,1 liegt und nach Tabelle 3 somit in der Nähe der Histidin-pK-Werte. Andere Aminosäuren haben pK-Werte, die trotz Verschiebung der pK-Werte im Ribonuclease-Molekül gegenüber der freien Aminosäure zu weit von unserem $pK_{a,T}$ -Wert entfernt liegen.

Wie eine genaue Betrachtung der Histidin-pK-Werte zeigt, sind diese in unterschiedlichem Maße von verschiedenen Faktoren abhängig. So fanden RÜTERJANS und WITZEL, daß die pK-Werte mit steigendem NaCl-Zusatz verschieden stark zunehmen (79), was ihrer Ansicht nach auf die Anwesenheit einer positiv geladenen Gruppe in unmittelbarer Nähe von His 12 und His 119 zurückzuführen ist. ROBERTS et al. stellten Untersuchungen zum Temperaturverhalten der pK-Werte der Histidine an (42). Aus ihren Ergebnissen kann man ersehen, daß generell wie beim freien Histidin mit steigender Temperatur der pK-Wert abnimmt. Greifen wir die beiden tiefsten Meßpunkte heraus (10 und 20° C), so ergeben sich folgende pK-Abnahmen pro Grad: His 12 : 0,011, His 105: 0,025, His 119 : 0,016, im Mittel also 0,017/° C. Obwohl diese Werte nicht exakt über den gesamten vermessenen Temperaturbereich (10 bis 41°) gültig sind (besonders His 12 weist eine deutliche Veränderung oberhalb ca. 32° C auf), sollen dennoch die angegebenen Werte linear bis auf 6° C herab extrapoliert und als linear verlaufend zwischen 6 und 20° C betrachtet werden.

Um die gefundene Kurve in eine Titrationskurve mit temperaturabhängigem pK-Wert umzuzeichnen, wurde eine mittlere Abnahme des pK-Wertes von 0,017 pro Temperaturzunahme um ein Grad zugrunde gelegt, eine genauere Differenzierung erscheint bei der Fehlerbreite der "Titrationskurve" wenig sinnvoll. Eine Gegenüberstellung beider Kurven sowie einer nach der HENDERSON-HASSELBALCH'schen Gleichung berechneten Titrationskurve zeigt Abb. 6. Man kann daraus ersehen, daß die Korrektur des temperaturabhängigen pK-Wertes nur einen geringen Einfluß auf die Kurve hat, und bei-

de Kurven, weder die gefundene noch die steilere, korrigierte, nicht nach der HENDERSON-HASSELBALCH'schen-Gleichung beschreibbar sind, da der S-förmige Kurvenabschnitt nur eine Breite von 1,4 bzw. 1,3 pH-Einheiten aufweist. Ob diese Diskrepanz auf die große Fehlerbreite unserer Kurve zurückzuführen ist, oder ob die Umlagerung der temperaturlabilen Aminosäure selbst das Dissoziationsgleichgewicht beeinflusst, läßt sich aus dem vorliegenden Material schwer entscheiden. Letztere Annahme würde voraussetzen, daß sich während der Umlagerung die Polarität der Umgebung der betreffenden Aminosäure verändert. Eine weitere Möglichkeit der Veränderung des Kurvenverlaufes besteht in einer dauernden Wechselwirkung der "anormalen" Aminosäure mit einem oder mehreren anderen polaren Aminosäureresten. Dies erscheint aber zur Erklärung der Diskrepanz zwischen der HENDERSON -HASSELBALCH'schen Titrationskurve und dem von uns gefundenen Kurvenverlauf wenig sinnvoll, da diese Wechselwirkung meist nur zu einer geringgradigen Verbreiterung der Kurve führt (80); lediglich zur Erklärung der Asymmetrie könnte dieser Gesichtspunkt dienen.

MEADOWS et al. (59, 81 siehe Tab. 3) haben die Änderungen der pK-Werte untersucht, die bei Anwesenheit einiger Inhibitoren, hauptsächlich Cytidin-Nucleotide, beobachtet werden. Histidin 105 wird durch diese Inhibitoren nicht beeinflusst. Die Histidine des aktiven Zentrums, His 12 und His 119, zeigen eine Zunahme der pK-Werte, die bei His 119 deutlicher von der chemischen Struktur des Inhibitors abhängig ist als bei His 12. Für Histidin 48 wurde angenommen, daß die Bindung eines Inhibitors das Konformations-Gleichgewicht des Enzyms beeinflusst.

Überhaupt kann man feststellen, daß His 48 eine Ausnahme gegenüber den anderen Histidinen darstellt. Es ist schwierig, für diese Aminosäure den pK-Wert zu bestimmen, da oberhalb pH 6 der His-48-Peak breiter und flacher wird, um schließlich unmeßbar zu werden. Dies kann damit zusammenhängen, daß diese Aminosäure gegenüber den anderen Histidinen die größte Flexibilität hat (82), auch tritt beim Erwärmen eine Verbreiterung dieses Bereiches des RNase-NMR-Spektrums ein (10, 38, 42). ROBERTS et al. (42) stellten darüber hinaus fest, daß beim Abkühlen auf 10° C His 48 Übergänge zwischen zwei verschiedenen Umlagerungen im

Enzym zeigt, gleiches Verhalten wird bei dieser Temperatur auch für His 119 angenommen. Anomalien bei den Verschiebungen von NMR-Peaks durch die Temperatur stellen auch WESTMORELAND und MATTHEWS (36) für His 119 und His 12 + 105 bei ca. 32° C fest, die Peakverschiebung von His 48 fanden sie dagegen bis 10° C als linear temperaturabhängig.

Bei dem Versuch, die erhaltene "Titrationskurve" durch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zu interpretieren, wurde bisher nicht berücksichtigt, daß diese Kurve aus dem enzymatischen Einwirken von RNase auf das Substrat C:p resultiert und nicht aus direkten Messungen an dem Enzym. Wie wir oben bereits andeuteten, verschieben die als Dianionen gebundenen Inhibitoren (Cytidin-Nucleotide) den pK von His 12 und His 119 zu höheren Werten. Es wird angenommen, daß auch das als Monoanion gebundene cyclische Cytidin-2', 3'-monophosphat eine derartige pK-Erhöhung verursachen kann, jedoch in geringerem Ausmaße (59). Besonders betroffen wäre davon His 119, an das das C:p stärker gebunden wird als an His 12 (59); für ersteres kann dann durchaus der von uns gefundene $pK_{a,T}$ -Wert von 7,1 resultieren.

Auch der von der HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung abweichende Verlauf unserer Kurve könnte seine Erklärung darin finden, daß unsere "Titrationskurve" mit $pK_{a,T}$ von 7,1 nicht nur durch einen Histidin-Rest bedingt ist, sondern der gesamte katalytische Prozeß mit erfaßt wird, d. h. auch vom Substrat beeinflusst wird.

Aus den dargelegten Ergebnissen anderer Arbeitskreise können wir für die Zuordnung der von uns gefundenen Anomalien zu einem bestimmten Histidin im RNase-Molekül folgende Entscheidung treffen:

Histidin 12: der pK_a -Wert von ca. 6 dürfte kaum durch das schwach gebundene C:p verschoben werden. Andererseits wird der pK-Wert ohne Unterschied von allen Cytidinnukleotid-Inhibitoren auf 8,0 erhöht, bei einer Wechselwirkung mit C:p wäre somit ebenfalls dieser Wert zu erwarten.

Histidin 105: Da alle bisher untersuchten Inhibitoren den pK-Wert von 6,7 unbeeinflusst lassen, können wir diese Aminosäure kaum für die gefundene

Anomalie verantwortlich machen.

Histidin 48: Eine sichere Aussage läßt sich bei Histidin 48 nicht machen, da noch zu wenige Untersuchungsergebnisse über diese Gruppe vorliegen. Besonders ist noch ungeklärt, ob das Substrat eine Verschiebung des pK von 6,4 auf 7,1 bewirken kann. Für diese Aminosäure als Ursache unserer Anomalie würde ihre oben erwähnte Instabilität sprechen. So fanden auch KING und BRADBURY (83) bei 34⁰ C eine Umlagerung von His 48. Da diese Aminosäure jedoch nicht am Aktiven Zentrum beteiligt ist, müßte ihre Umlagerung nur indirekt durch Weiterleitung zum Aktiven Zentrum die Anomalie bedingen.

Histidin 119: Neben His 48 erscheint uns diese Aminosäure am wahrscheinlichsten, die Unstetigkeit im ARRHENIUS-Diagramm zu bedingen. Dafür spricht, daß es durchaus möglich ist, ihren pK-Wert von 5,8 durch das Substrat auf 7,1 zu erhöhen. Weiterhin haben ROBERTS et al. wie erwähnt auch für diesen Rest Umlagerungen bei ca. 10⁰ C vermutet.

Zusammenfassend kann man nach kritischer Betrachtung der Ergebnisse feststellen, daß von den vier genannten Histidinen His 48 und His 119 in die engere Wahl gezogen werden können und die beobachtete kinetische Anomalie am wahrscheinlichsten mit einer Konfigurationsänderung im Bereich des His 119 oder einer Lageänderung dieser im Aktiven Zentrum gelegenen Aminosäure selbst zu deuten ist.

Abschließend seien noch einige Gesichtspunkte angeführt, die erklären sollen, warum bisher andere Forschergruppen diese Anomalie nicht aufgefunden haben. Da die meisten Messungen in gepufferten Systemen und mit Ionenstärken von ca. $I = 0,2$ und mehr durchgeführt wurden, wurden die Anomalien dadurch unterdrückt (53). Die dabei meist im UV-Bereich durchgeführten Messungen der Normalisierung anormaler Tyrosine, z. B. von TSONG et al. (20, 21) müssen nicht unbedingt die von uns aufgefundenen Anomalien ergeben, da die dabei vermessenen Phenylringe der Tyrosine kein Indikator für Strukturveränderungen nahe dem aktiven Zentrum sein müssen (10). Weiterhin muß bemerkt werden, daß die Anomalie bei

reinen RNase-Lösungen ohne C:p nicht bei den angegebenen Temperaturen auftreten muß sondern tiefer liegen kann, da bekannt ist, daß z. B. an RNase gebundene Cytidin-Nucleotid-Inhibitoren die thermische Denaturierung von RNase zu höheren Temperaturen verschieben (10). Das Substrat C:p könnte den gleichen Effekt bewirken und T_m der Unstetigkeitsstelle erhöhen. Schließlich sei festgestellt, daß kaum Arbeiten über das Verhalten von RNase unterhalb 10 ... 15° C vorliegen, jedoch deuten manche Effekte auf die von uns bei höheren Temperaturen gefundenen Unstetigkeiten hin (53). Auch SCHECHTER und SACHS (80) fanden, daß bei isothermem Übergang (22° C) vom alkalischen ins saure Medium an RNase eine Konformationsänderung eintritt, die sich in einer geringen Störung der Histidin-Peaks äußert.

Die in dieser Arbeit aufgezeigten Ergebnisse, die aus kinetischen Messungen gewonnen wurden, können als guter Hinweis für das Modell der schrittweisen Konformationsänderung des Proteins mit steigender Temperatur bis zur völligen Denaturierung gewertet werden, wie man es aufgrund physikalischer Befunde postulierte.

5. Anhang

5.1. Reagenzien und Lösungen

Die verwendete RNase aus Rinderpankreas wurde von der Firma Serva (Heidelberg) bezogen (5 x kristallisiert; 45 Kunitz-E/mg). Unterwirft man sie an Sephadex G 75 bzw. G 50 der Gelchromatographie, so tritt bei Elution mit Wasser oder 0,01 N NaCl ein fast symmetrischer Peak auf, was auf nur geringe Beimengungen von RNase B hindeutet; auf eine weitere Reinigung wurde daher verzichtet. Die damit hergestellten Lösungen von ca. 13 mg/100 ml wurden spektroskopisch auf ihre genaue Konzentration unter Zugrundelegung eines molaren Extinktionskoeffizienten von 9800 bei pH 6,5 und 278 μm (84) überprüft. Die Lösungen erwiesen sich als sehr stabil; innerhalb von acht Wochen konnte keine Aktivitätsabnahme festgestellt werden, wenn man die Lösung ständig bei 0 ... 4° C aufbewahrte.

Das cyclische Cytidin-2',3'-monophosphat lieferten Schwarz Bio Research (Lot. 6501) und E. Merck AG (Darmstadt) als Ba-Salz. Obwohl während eines Tages in wäßriger, ungepufferter Lösung keine Hydrolyse des C:p festgestellt werden konnte, wurden die Substratlösungen dennoch täglich neu angesetzt und unter Eiskühlung aufbewahrt. Die eingesetzten Substratkonzentrationen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Das zum Ansetzen der Lösungen verwendete Wasser war doppelt destilliert und durch Stickstoff CO_2 -frei gemacht. Dieses und alle Lösungen wurden stets unter Stickstoff aufbewahrt.

Sämtliche Lösungen waren frei von Fremdsalzen. Die Zunahme der Ionenstärke durch Austritt von KCl aus der Elektrode konnte vernachlässigt werden, wie Leitfähigkeitsmessungen zeigten, ebenso wurde die Titerzugabe bezüglich der Ionenstärke nicht berücksichtigt, da der Anstieg maximal 2×10^{-3} Mol/l betrug und generell die Anfangsgeschwindigkeit in unsere Betrachtungen eingeht, die von dieser Zunahme frei ist.

Die zum Titrieren der bei der Hydrolyse frei werdenden Säure verwandte NaOH war 0,00496 molar. Sie wurde stets unter N_2 aufbewahrt.

5.2. Apparatur

Das temperierbare Reaktionsgefäß ist mit einem Rührer, einem Gaseinleitungsröhr für N_2 sowie je einer Kalomel- und Glaselektrode versehen. Der verwendete vorgereinigte Stickstoff (Linde) wurde zusätzlich mit gesättigter KOH-Lösung gewaschen und über die Reaktionslösung gebliesen, um diese vor dem CO_2 der Luft zu schützen. Die beiden Elektroden waren an den Autotitrator (pH-Meter 25 + Titrator 11, Radiometer) angeschlossen. Bei Änderung des vorgegebenen pH-Wertes um 0,02 Einheiten wird ein Impuls vom Titrator an die Autoburette (ABU 12, Radiometer) weitergegeben, die zur Wiederherstellung des vorgegebenen pH-Wertes benötigte Menge an NaOH in die Reaktionslösung eingespritzt und das Volumen der verbrauchten Lauge in Abhängigkeit von der Zeit vom Titrograph (SBT 2c, Radiometer) bis zu einem Maximalwert von 0,25 ml registriert. Aus den aufgezeichneten Zeit-Umsatz-Kurven konnte anschließend die Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt werden. Es wurden die Halbmakroelektroden Glas G 2222 C und Kalomel K 4112, beide Radiometer Kopenhagen, verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug 1,05 ml. Ein Blockdiagramm der beschriebenen Apparatur zeigt Abb. 7.

Vor Beginn einer jeden Meßreihe wurden die Elektroden bei $20^\circ C$ mit Phosphatpuffer pH 7,00 geeicht, am Ende der Meßreihe wurden sie nochmals auf Konstanz geprüft, die Abweichung war immer $< 0,04$ pH-Einheiten.

Die Temperierung des Reaktionsgefäßes erfolgte mittels eines Thermostaten mit eingebautem Kühlaggregat (Colara, Kryo-Thermostat WK 5), dessen Wassertemperatur eine Konstanz von $\pm 0,02$ grad aufweist. Die Temperatur wurde mit einem geeichten Thermometer, das kurz vor dem Reaktionsgefäß im Kreislauf des Temperierwassers eingesetzt war, kontrolliert und auf 0,05 grad genau abgelesen.

5.3. Meßvorgang

In das Reaktionsgefäß wird 1 ml Substratlösung vorgelegt. Bei laufendem

Rührer wird genau 5 min N_2 über die Lösung im temperierten Reaktionsgefäß geleitet; in dieser Zeit findet Temperatureausgleich zwischen Lösung und Gefäß statt und noch vorhandenes CO_2 wird durch den Stickstoffstrom verdrängt; die Lösung hat dadurch einen konstanten pH-Wert angenommen. Sodann wird mit NaOH aus der Autobürette der pH-Wert der Lösung auf den gewünschten Wert eingestellt, der Titrigraph gestartet und der NaOH-Verbrauch über 2 Minuten aufgezeichnet. Diese kurze Zeitspanne genügt, da der Blindwert der Hydrolyse vernachlässigbar klein ist (bei pH 8,1 und 8,3 wurde der Hydrolyseblindwert für jede Temperatur gesondert bestimmt). Bei laufender Apparatur wird nun mit einer Marburg-Pipette (Metheler und Hinz, Hamburg-Eppendorf), deren verlängerte Spitze vor Beginn jeder Messreihe 7mal mit Enzymlösung gespült wurde, um die Oberfläche mit Protein zu sättigen (85), und die nun in die Lösung eingetaucht, schnell 0,050 ml Enzymlösung zugesetzt, so daß die Reaktionslösung ca. $6,5 \mu\text{g Enzym}/1,05 \text{ ml}$ enthält. Die einsetzende Reaktion wird ca. 4 Minuten lang verfolgt. Bei jeder Temperatur werden 2...4 derartige Messungen durchgeführt, bei Änderung der Reaktionstemperatur dies am pH-Meter 2% durch Temperaturkompensation berücksichtigt.

Die in der vorliegenden Arbeit angeführten Bruttoreaktionsgeschwindigkeiten v_{Br} haben die Dimension μl verbrauchte 0,00489 r NaOH pro 10 Minuten. Diese Angaben lassen sich leicht in die Dimension μMol umgesetzt Substrat pro Minute umrechnen, indem man sie mit dem Faktor $4,89 \times 10^{-4}$ multipliziert.

ABBILDUNGEN

TABELLEN

LITERATUR

Tabelle 1

Zusammenstellung der bisher bei Ribonuclease vermuteten oder experimentell gefundenen Umwandlungen unterhalb der Denaturierungstemperatur

Temperatur	pH	Meßmethode	Literatur
10°C	5,5	C(2)-Protonen-Resonanz an His 48 und His 119	(38, 42)
7°C, 23°C	6,5	enzymatische Aktivität	(50)
13°C, 25°C	7,2	enzymatische Aktivität	(50)
14...32°C	6,86	NMR	(44)
15°C, 50°C	6,46	Zirkular-Dichroismus	(31)
30°C	ca. 0,4	Chromatographie	(85a)
30...35°C	4...9	Ermittlung der Enzym-Kinetik	(68)
32...36°C	1,3	NMR	(36)
32...40°C	var.	NMR	(42)
35°C	5,5	EPR an markierter RNase	(10)
38°C	6,0	Säulenchromatographie	(86)
40...50°C	5,8	NMR	(38)

Tabelle 2.

Nr.	pH	Temp. von	Temp. bis	Temp.- Schritte	Meßwerte	Fehler- breite	c _{Nase} [mg/ml]	c _{Substr.} [mg/ml]	T _m [°C]	E _{exp, 1} [kcal/Mol]	E _{exp, 2} [kcal/Mol]
1	6,28	3,3	18,4	8	19	2,454	0,00714	3,013	6,9 ± 1,4	13,64	10,09
2	6,71	4,1	15,4	5	13	4,492	0,00714	3,740	7,3 ± 0,6	25,41	7,28
3	6,90	3,1	18,3	7	17	1,718	0,00714	3,819	7,65 ± 1,8	15,09	7,17
4	7,10	2,8	17,3	7	18	1,459	0,00714	3,767	10,45 ± 1,5	10,18	5,28
5	7,15	3,2	21,2	8	19	2,083	0,0060	1,024	10,8 ± 0,9	4,46	2,17
6	7,15	3,2	21,2	8	19	1,927	0,0060	1,410	10,8 ± 0,7	5,48	3,93
7	7,15	3,2	21,2	8	19	1,277	0,0060	2,486	10,8 ± 0,6	6,67	4,46
8	7,15	3,2	21,2	8	20	1,426	0,0060	3,810	10,6 ± 0,7	9,41	5,16
9	7,15	3,2	21,2	8	20	0,570	0,0060	9,424	10,95 ± 0,7	9,50	5,21
10	7,30	3,1	19,2	7	16	1,358	0,00714	3,790	9,65 ± 1,8	8,57	4,13
11	7,30	5,4	25,3	8	18	1,808	0,00714	3,848	12,15 ± 1,5	8,42	3,69
12	7,50	4,0	23,5	8	18	1,085	0,00714	3,919	13,0 ± 1,3	5,99	1,85
13	7,70	4,0	24,0	8	20	0,778	0,00714	3,795	13,75 ± 0,6	4,01	- 0,60
14	7,91	4,9	27,2	8	17	1,933	0,00714	3,905	12,8 ± 3,7	3,07	- 1,59
15	7,91	5,0	23,3	9	17	1,324	0,00714	3,786	16,35 ± 2,1	2,16	- 2,71
16	7,91	5,4	21,2	8	25	1,122	0,00714	3,783	14,3 ± 1,1	1,56	- 1,60
17	8,10	4,0	27,3	8	17	2,695	0,00714	3,867	14,2 ± 2,8	0,67	- 6,75
18	8,10	4,2	27,8	10	25	1,609	0,00714	3,848	13,95 ± 1,7	0,30	- 2,28
19	8,32	4,3	27,0	9	25	1,692	0,00714	3,752	14,1 ± 1,2	- 2,70	- 3,66

Zusammenstellung der Daten der ARRHENIUS-Diagramme und der aus ihnen entnommenen Werte.

Tabelle 3 a

Zusammenstellung der polaren Aminosäuren in Ribonuclease

Aminosäure polare Gruppe pK_{frei} (87)	Position in RNase (88)	pK in RNase	Literatur
<u>Asparaginsäure</u>	14		
β -Carboxyl-Gruppe	38		
	53		
3,86	83		
	121	4,52 gekoppelt mit His 119	(80)
<u>Glutaminsäure</u>	2		
γ -Carboxyl-Gruppe	9		
	49		
4,25	86		
	111		
<u>Histidin</u>	12	} siehe Tabelle 3 b	
Imidazol-Ring	48		
	105		
0° C: 6,83 (89)	119		
25° C: 6,04			
<u>Tyrosin</u>	25	über 11	(74)
		über 11,5 (25° C; I = 0,15)	(75)
phenolische	73	10...10,2	(74)
Hydroxyl-Gruppe		9,9 (25° C; I = 0,15)	(75)
10,07	76	10...10,2	(74)
		9,9 (25° C; I = 0,15)	(75)
	92	über 11	(74)
		über 11,5 (25° C; I = 0,15)	(75)
	97	über 11	(74)
		über 11,5 (25° C; I = 0,15)	(75)
	115	10...10,2	(74)
		9,9 (25° C; I = 0,15)	(75)
<u>Lysin</u>	1		
ϵ -Amino-Gruppe	7		
	31		
10,53	37		
	41	8,4 gekoppelt mit His 12	(80)
	61		
	66		
	91		
	98		
	104		
<u>Arginin</u>	10		
Guanidino-Gruppe	33		
	39		
12,48	85		

Tabelle 3 b

Übersicht über die pK-Werte, die bisher für die vier in Ribonuclease enthaltenen Histidine ermittelt wurden

	pK	Bedingungen	Literatur
<u>His 12</u>	6,2		(81)
aktives	8,0	bei Zusatz von 3'-CMP	(81)
Zentrum	6,2	(gekoppelt mit Lys 41) 22°C; 0,1m NaOH	(80)
	5,8	32°C	(77)
	6,2	32°C; 0,2m NaOAc	(90)
	5,6	unter 0,1m NaCl; 30°C	(79)
	6,1	0,2m NaCl; 30°C	(79)
	6,3	0,4m NaCl; 30°C	(79)
	5,8	34°C	(83)
	6,2	0,2m NaOAc; 32°C	(42)
	6,46	0,2m NaCl; 10°C	(42)
	6,35	0,2m NaCl; 20°C	(42)
	6,23	0,2m NaCl; 32°C	(42)
	5,77	0,2m NaCl; 41°C	(42)
	6,2	0,1m NaCl; 33°C	(91)
	8,0	0,2m NaCl; 32°C; Zusatz von 3'-CMP	(59)
	8,0	0,2m NaCl; 32°C; Zusatz von 2'-CMP	(59)
	8,0	0,2m NaCl; 32°C; Zusatz von 5'-CMP	(59)
	6,2	0,2m NaCl; 32°C; Zusatz von Cytidin	(59)
	6,9	0,2m NaCl; 32°C; Zusatz von Phosphat	(59)
	5,6	0,2m NaCl; 32°C; Zusatz von Sulphat	(59)
	6,3	0,2m NaCl; 31°C	(92)
	6,03	0,2m NaCl; 37,5°C	(36)
<u>His 48</u>	?	gekoppelt mit Asp 14 und/oder Tyr 25	(80)
	6,4	0,2m NaOAc; 32°C	(90)
	6,4	0,2m NaOAc; 32°C	(42)
<u>His 105</u>	6,7	0,1m NaCl; 22°C	(80)
	6,6	32°C	(77)
aktives	6,7	0,2m NaOAc; 32°C	(90)
Zentrum	6,4	unter 0,1m NaCl; 30°C	(79)
	6,5	0,2m NaCl; 30°C	(79)
	6,6	0,4m NaCl; 30°C	(79)
	6,4	34°C	(83)
	6,7	0,2m NaOAc; 32°C	(42)
	7,10	0,2m NaCl; 10°C	(42)
	6,85	0,2m NaCl; 20°C	(42)
	6,65	0,2m NaCl; 32°C	(42)
	6,45	0,2m NaCl; 41°C	(42)
	6,85	0,1m NaCl; 33°C	(91)
	6,7	0,2m NaCl; 32°C; Zusatz von 2'-CMP	(59)
	6,7	0,2m NaCl; 32°C; Zusatz von 3'-CMP	(59)
	6,7	0,2m NaCl; 32°C; Zusatz von 5'-CMP	(59)
	6,7	0,2m NaCl; 32°C; Zusatz von Cytidin	(59)
	6,7	0,2m NaCl; 32°C; Zusatz von Phosphat	(59)
	6,7	0,2m NaCl; 32°C; Zusatz von Sulphat	(59)
	6,7	0,2m NaCl; 31°C	(92)
	6,52	0,2m NaCl; 37,5°C	(36)
<u>His 119</u>	5,8		(81)
	7,4	Zusatz von 3'-CMP	(81)
	6,05	0,1m NaCl; 22°C; gekoppelt mit Asp 121	(80)
	5,4	32°C	(77)
	5,8	0,2m NaOAc; 32°C	(90)
	5,1	unter 0,1m NaCl; 30°C	(79)
	5,8	0,2m NaCl; 30°C	(79)
	6,1	0,4m NaCl; 30°C	(79)
	5,2	34°C	(83)
	5,8	0,2m NaOAc; 32°C	(42)
	6,06	0,2m NaCl; 10°C	(42)
	5,90	0,2m NaCl; 20°C	(42)
	5,70	0,2m NaCl; 32°C	(42)
	5,45	0,2m NaCl; 41°C	(42)
	5,5	0,1m NaCl; 33°C	(91)
	7,4	0,2m NaCl; 32°C; Zusatz von 3'-CMP	(59)
über	8,0	0,2m NaCl; 32°C; Zusatz von 2'-CMP	(59)
unter	7,0	0,2m NaCl; 32°C; Zusatz von 5'-CMP	(59)
	6,4	0,2m NaCl; 32°C; Zusatz von Cytidin	(59)
	6,6	0,2m NaCl; 32°C; Zusatz von Phosphat	(59)
	6,2	0,2m NaCl; 32°C; Zusatz von Sulphat	(59)
	5,8	0,2m NaCl; 31°C	(92)
über	8	0,2m NaCl; 31°C; Zusatz von 3'-CMP	(92)
	6,5	0,2m NaCl; 31°C; Zusatz von 3'-UMP	(92)
	5,62	0,2m NaCl; 37,5°C	(36)

Abbildung 1:

Darstellung der in Tabelle 2 mit Nr. 1, 11 und 18 bezeichneten
ARRHENIUS-Kurven. Sie zeigen die Temperaturabhängigkeit der Hydrolyse
von C:p durch RNase bei drei verschiedenen pH-Werten.

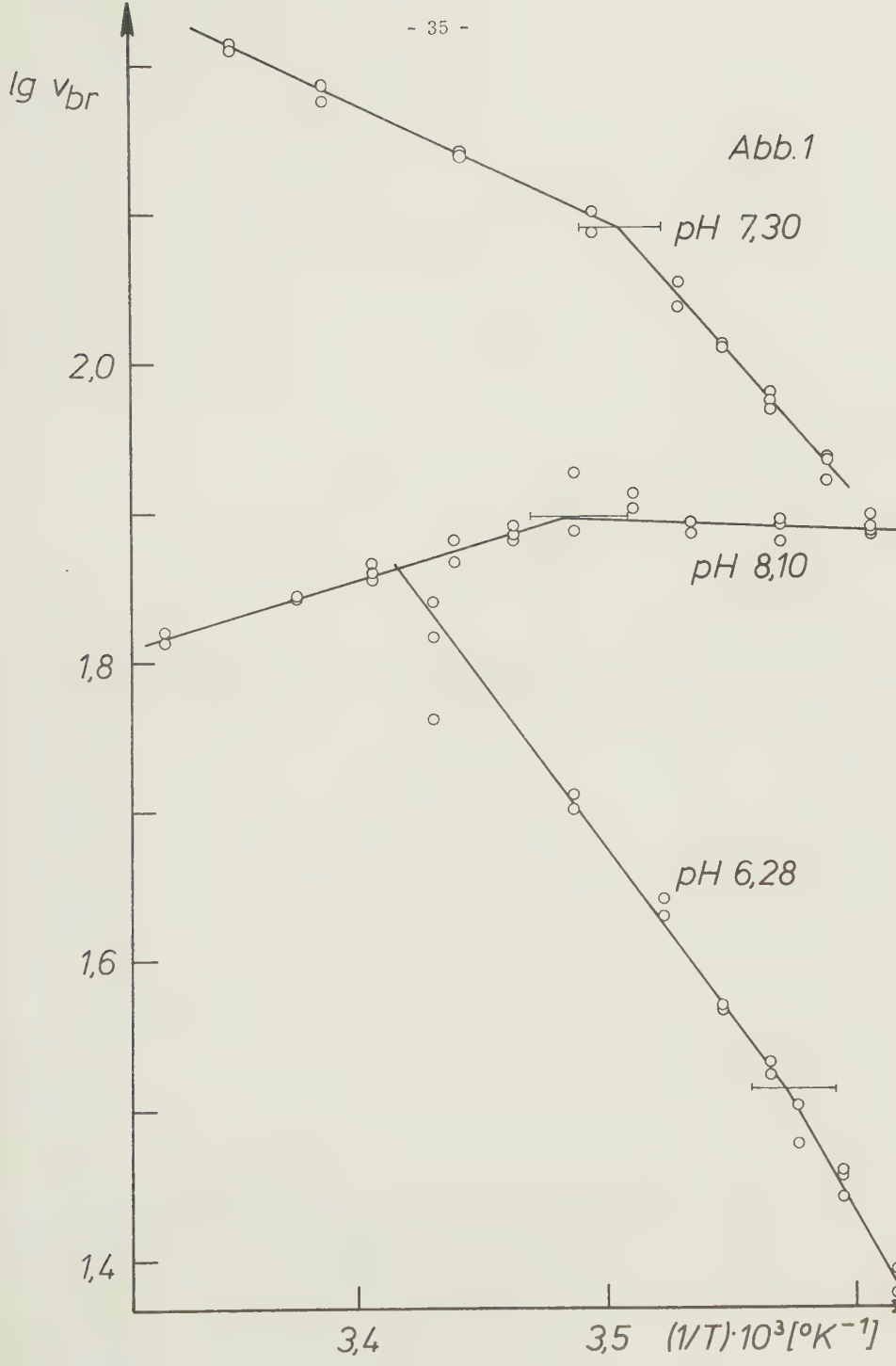


Abbildung 2:

Auftragung der Mittelpunkte T_m der Unstetigkeitsstellen und den jeweiligen Unstetigkeitsbereichen gegen den pH-Wert. Die beiden Meßpunkte $\square$ sind aus (50) übernommen.

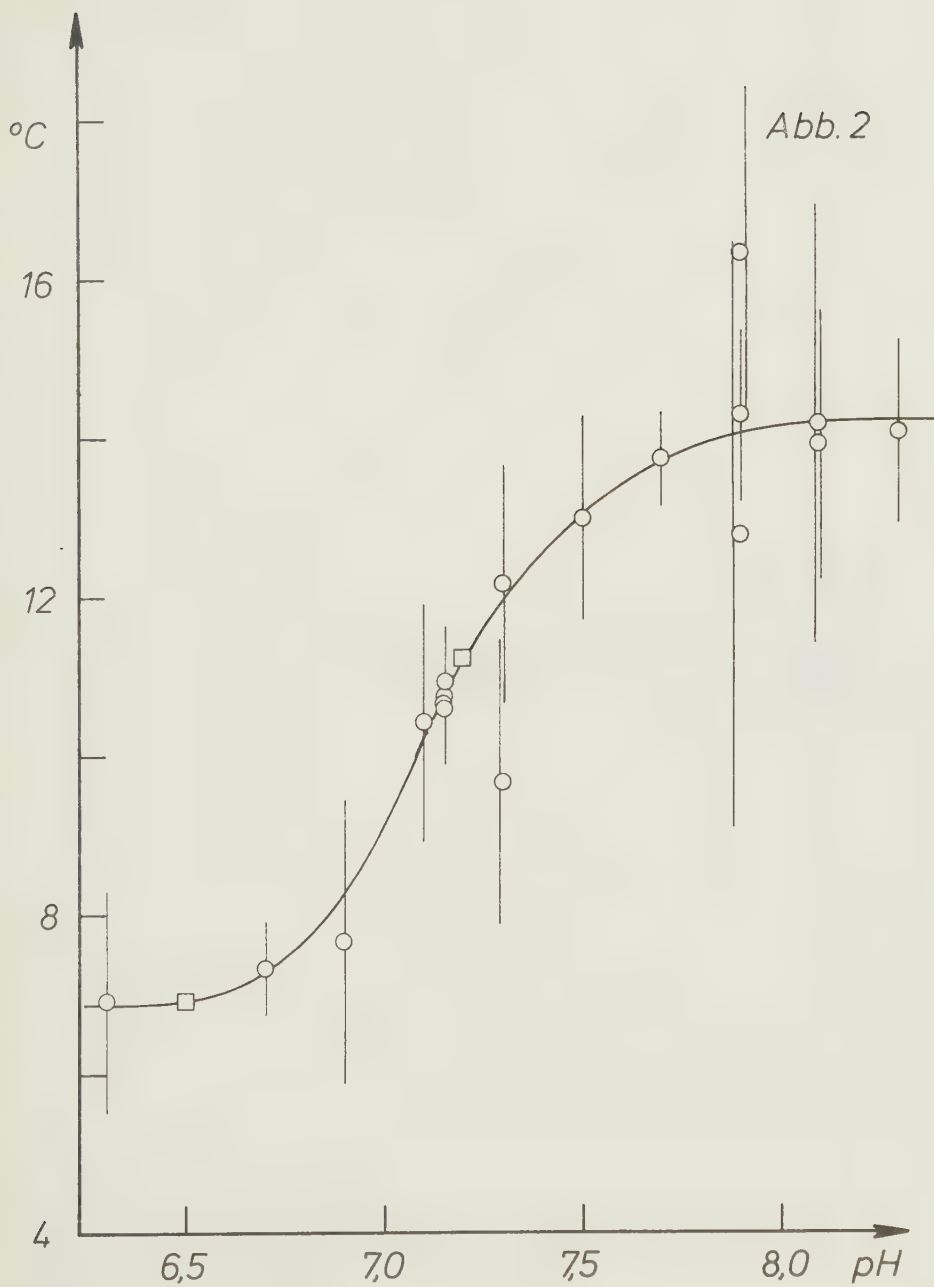


Abbildung 3:

Temperaturabhängigkeit der MICHAELIS-Konstanten K_m bei pH 7, 15.
Logarithmische Auftragung von K_m (Dimension Mol/l) gegen die reziproke absolute Temperatur.

Abb. 3



Abbildung 4:

Temperaturabhängigkeit von $V_{\max}$ bei pH 7, 15. Logarithmische Auftragung von $V_{\max}$ versus reziproke absolute Temperatur.

Abb. 4

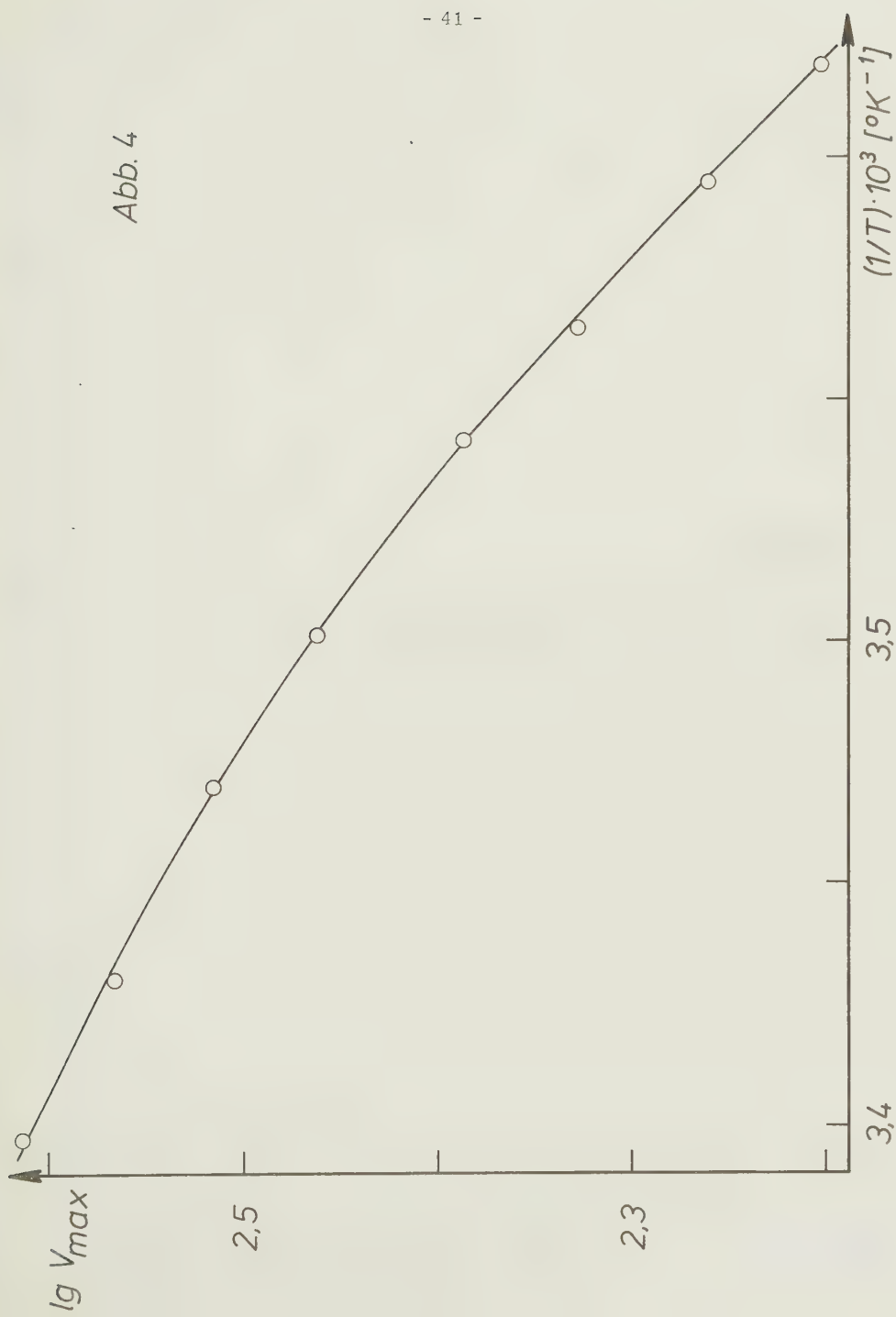


Abbildung 5:

Graphische Darstellung der pH-Abhängigkeiten von $E_{\text{exp},1}(0)$ und $E_{\text{exp},2}(0)$ (siehe auch Tabelle 2). Die Werte bei pH 6,5 und 7,2 ($\square$ bzw. $\boxminus$) wurden aus (50) entnommen.

$$\frac{\text{kcal}}{\text{Mol}}$$

Abb. 5



10

0

6,5

75

pH

 E_{exp}^1 $E_{exp} 2$

Abbildung 6:

Vergleich der aus Abb. 2 entnommenen pH-Abhängigkeit der Unstetigkeitsstelle T_m (———) sowie der daraus ermittelten temperaturkorrigierten Kurve (-----) (siehe Text) mit einer HENDERSON-HASSELBALCH'schen Titrationskurve. Letztere wurde so berechnet, daß ihr pK-Wert bei pH 7,1 und ihre beiden Asympdoten bei 6,9° C und 14° C liegen (-.-.-.-).

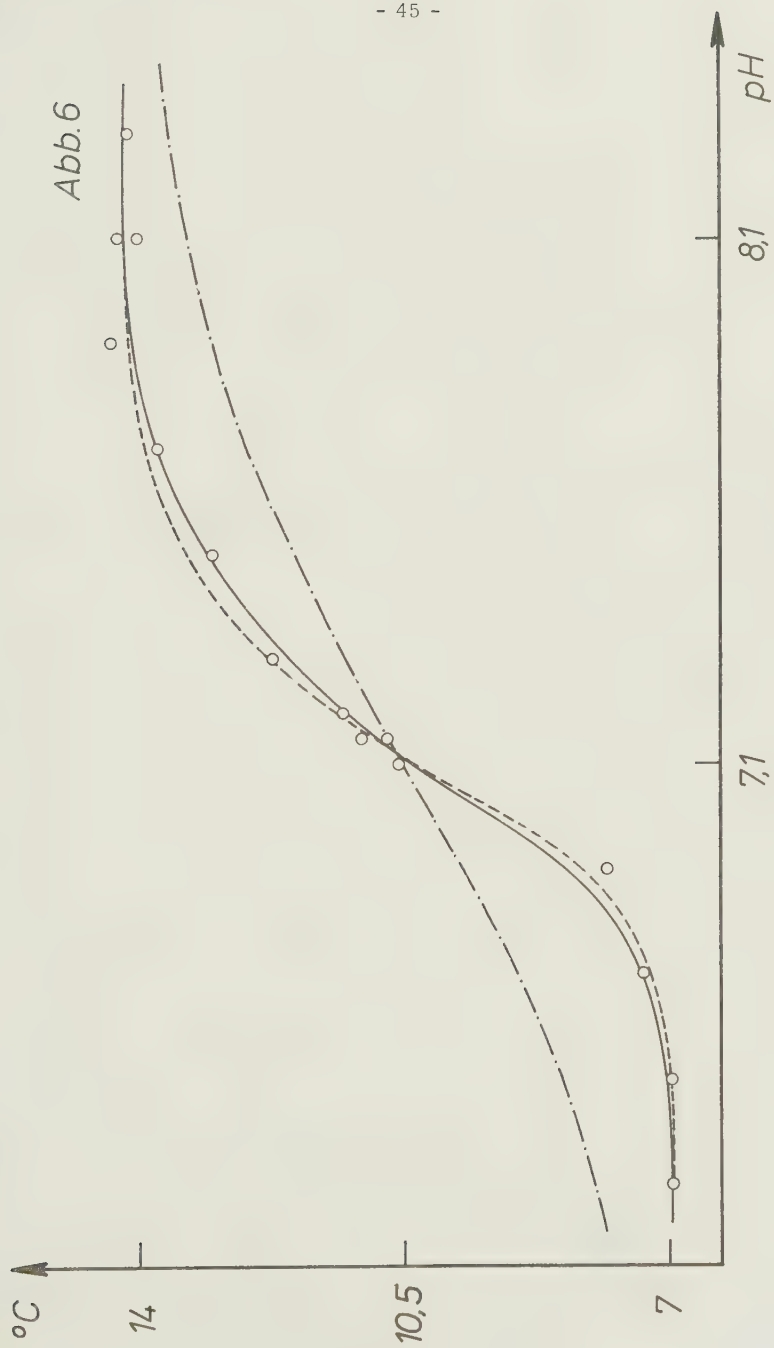
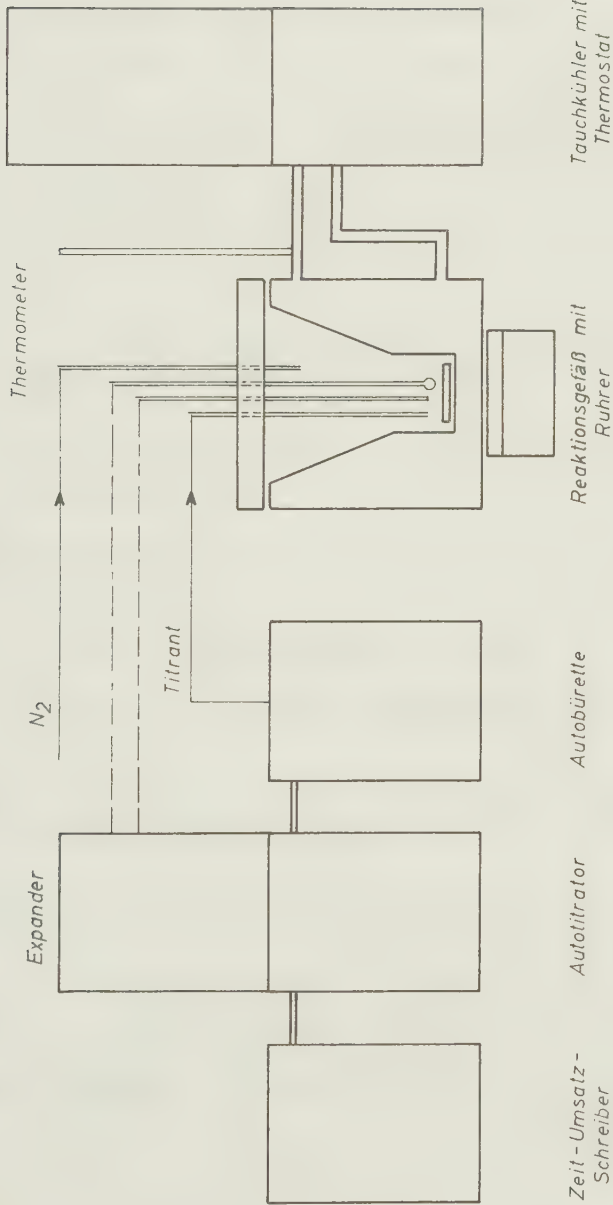


Abbildung 7:

Schematische Darstellung der Apparatur zur titrimetrischen Verfolgung von Enzymreaktionen.



Zeit-Umsatz-
Schreiber

Abb. 7

Literaturverzeichnis

Verwendete Abkürzungen:

BBA	Biochimica et Biophysica Acta
BJ	Biochemical Journal
JACS	Journal of the American Chemical Society
JBC	Journal of the Biological Chemistry

- (1) J. C. KENDREW, H. C. MATSON, B. E. STRANDBERG, R. E. DICKERSON, D. C. PHILLIPS und V. C. SHORE, Nature (London), 190 (1961) 666
- (2) R. LUMRY, R. BILTONEN und J. F. BRANDTS, Biopolymers, 4 (1966) 917
- (3) T. Y. TSONG, R. P. HEARN, D. P. WRATHALL und J. M. STURTEVANT, Biochemistry, 9 (1970) 2666
- (4) CH. TANFORD, Advances Prot. Chem., 24 (1970) 1
- (5) H. F. EPSTEIN, A. N. SCHECHTER und J. S. COHEN, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 68 (1971) 2042
- (6) O. JARDETZKY, J. L. MARKLEY, H. THIELMANN, Y. ARATA und M. N. WILLIAMS, Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol., 36 (1971) 257
- (7) K. HOFMANN, F. FINN, W. HAAS, M. J. SMITHERS, Y. WOLMAN und N. YANAIHARA, JACS, 85 (1963) 833
- (8) B. GUTTE und R. B. MERRIFIELD, JACS, 91 (1969) 501
- (9) R. HIRSCHMANN, R. F. NUTT, D. F. VEBER, R. A. VITALI, S. L. VARGA, TH. A. JACOB, F. W. HOLLY, R. G. DENKEWALTER, JACS, 91 (1969) 507

- (10) I.C.P. SMITH, Biochemistry, 7 (1968) 745
- (11) CH.C. BIGELOW, J. Mol. Biol., 8 (1964) 696
- (12) A. SALAHUDDIN und CH. TANFORD, Biochemistry, 9 (1970) 1342
- (13) F. DELBEN, V. CRESCENZI und F. QUADRIFOGLIO, Int. J. Protein Research, 1 (1969) 145
- (14) T.Y. TSONG , R.P. HEARN, D.P. WRATHALL und J. M. STURTEVANT, Biochemistry, 9 (1970) 2666
- (15) B.G. WINCHESTER, A.P. MATHIAS und B.R. RABIN, BJ, 117 (1970) 299
- (16) K. BECK, S.J. GILL und M. DOWNING, JACS, 87 (1965) 901
- (17) G.C. KRESHECK und H.A. SCHERAGA, JACS, 88 (1966) 4588
- (18) R. DANFORTH, H. KRAKAUER und J.M. STURTEVANT, Rev.Sci. Instrum., 38 (1967) 484
- (19) P. McPHIE, Biochemistry, 11 (1972) 879
- (20) T.Y. TSONG, R.L. BALDWIN und P. McPHIE, J. Mol. Biol., 63 (1972) 453
- (21) T.Y. TSONG, R.L. BALDWIN und E.L. ELSON, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 68 (1971) 2712
- (22) A. GINSBURG und W.R. CARROLL, Biochemistry, 4 (1965) 2159
- (23) D.N. NOLCOMB und K.E. VAN HOLDE, J. Phys. Chem., 66 (1962) 1999
- (24) P.H. VON HIPPEL und K.-Y. WONG, JBC, 240 (1965) 3909
- (25) J. HERMANS Jr. und H.A. SCHERAGA, JACS, 83 (1961) 3293

- (26) CH. A. NELSON und J. P. HUMMEL, JBC, 237 (1962) 1567
- (27) R. A. SCOTT und H. A. SCHERAGA, JACS, 85 (1963) 3866
- (28) J. HERMANS Jr. und H. A. SCHERAGA, JACS, 83 (1961) 3283
- (29) L. M. SHERWOOD und J. T. POTTS Jr., JBC, 240 (1965) 3799
- (30) W. A. KLEE, Biochemistry, 6 (1967) 3736
- (31) E. R. SIMONS, E. G. SCHNEIDER und E. R. BLOUT, JBC, 244 (1969) 4023
- (32) D. PUETT, Biochemistry, 11 (1972) 1980
- (33) G. C. K. ROBERTS und O. JARDETSKY, Adv. Protein Chem., 24 (1970) 447
- (34) F. W. BENZ und G. C. K. ROBERTS, FEBS Letters, 29 (1973) 263
- (35) J. H. BRADBURY und N. L. R. KING, Nature (London), 223 (1969) 1154
- (36) D. G. WESTMORELAND und C. R. MATTHEWS, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70 (1973) 914
- (37) C. C. McDONALD und W. D. PHILLIPS, JACS, 89 (1967) 6332
- (38) O. R. ZABORSKY und G. E. MILLIMAN, BBA, 271 (1972) 274
- (39) V. GLUSHKO, P. J. LAWSON und F. R. N. GURD, JBC, 247 (1972) 3176
- (40) J. H. BRADBURY und N. L. R. KING, Aust. J. Chem., 25 (1972) 209
- (41) M. MANDEL, Biochemistry, 52 (1964) 736
- (42) G. C. K. ROBERTS, D. H. MEADOWS und O. JARDETZKY, Biochemistry, 8 (1969) 2053
- (43) M. SAUNDERS und A. WISHNIA, Ann. N. Y. Acad. Sci., 70 (1958) 870
- (44) J. P. C. ADDAD, J. Mol. Biol., 50 (1970) 595

- (45) E.A. BARNARD, J. Mol. Biol., 10 (1964) 263
- (46) T.Y. TSONG, R.L. BALDWIN und E.L. ELSON, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69 (1972) 1809
- (47) J.F. BRANDTS und L. HUNT, JACS, 89 (1967) 4826
- (48) T.C. FRENCH und G.G. HAMMES, JACS, 87 (1965) 4669
- (49) F.W. BENZ und G.C. K. ROBERTS, FEBS Letters, 29 (1973) 263
- (50) G. TALSKY und W. MÜLLER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 352 (1971) 1681
- (51) G. TALSKY, Angew. Chem., 83 (1971) 553
- (52) W. MÜLLER und G. TALSKY, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., 351 (1970) 1564
- (53) W. MÜLLER, Dissertationsschrift, TH-München, 1970
- (54) D.G. HERRIES, Biochem. Biophys. Research Commun., 3 (1960) 666
- (55) J.P. HUMMEL, M. FLORES und G. NELSON, JBC, 233 (1958) 717
- (56) M. LITT, BBA, 60 (1962) 644
- (57) H. WITZEL, Progr. Nucl. Acid Res., 2 (1963) 221
- (58) W. MÜLLER, Diplom-Arbeit, TH-München, 1968
- (59) D.H. MEADOWS, G.C.K. ROBERTS und O. JARDETZKY, J. Mol. Biol., 45 (1969) 491
- (60) J.T. BAHR, R.E. CATHOU und G.G. HAMMES, JBC, 240 (1965) 3372
- (61) E. VOLKIN und W.E. COHN, JBC, 205 (1953) 767
- (62) L.F. CAVALIERI, JACS, 74 (1952) 5804

- (63) J.E. ERMAN und G.G. HAMMES, JACS, 88 (1966) 5607
- (64) H. FOLLMANN, H.-J. WIEKER und H. WITZEL, European J. Biochem., 1 (1967) 243
- (65) M. DIXON und E.C. WEBB, Enzymes, 2nd ed., 1964, Longmans Green, and Co. Ltd., London, S. 158 ff
- (66) F.J. KAYNE und C.H. SUELTER, JACS, 87 (1965) 897
- (67) H.M. LEVY, N. SHARON, E.M. RYAN und D.E. KOSHLAND Jr., BBA, 56 (1962) 118
- (68) V.L. ANTONOVSKII und YU. V. SHURUKHIN, Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim., 1973, 482; ref. in: Chem. Abstr., 79 (1973) 15011j
- (69) H. NEUMANN, I.Z. STEINBERG, J.R. BROWN, R.F. GOLDBERGER und M. SELA, European J. Biochem., 3 (1967) 171
- (70) A.M. CRESTFIELD, W.H. STEIN und S. MOORE, JBC, 238 (1963) 2413 und 2421
- (71) R.L. HEINRIKSON, W.H. STEIN, A.M. CHESTFIELD und S. MOORE, JBC, 240 (1965) 2921
- (72) R.L. HEINRIKSON, JBC, 241 (1966) 1393
- (73) F.M. RICHARDS, H.W. WYCKOFF und N.M. ALLEWELL, in The Neurosciences (Schmitt, F.O., Ed., 1969)
- (74) N.-T. YU, B.H. JO und C.S. LIU, JACS, 94 (1972), 7572
- (75) CH. TANFORD, J.D. HAUENSTEIN und D.G. RANDS, JACS, 77 (1956) 6409
- (76) G.C.K. ROBERTS und O. JARDETZKY, Advances Prot. Chem., 24 (1970) 448
- (77) J.H. BRADBURY und H.A. SCHERAGA, JACS, 88 (1966) 4240

- (78) D.H. MEADOWS, J.L. MARKLEY, J.S. COHEN und O. JARDETZKY, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 58 (1967) 1307
- (79) H. RÜTERJANS und H. WITZEL, European J. Biochem., 9 (1969) 118
- (80) A.N. SCHECHTER, D.H. SACHS, S.R. HELLER, R.I. SHRAGER und J.S. COHEN, J. Mol. Biol., 71 (1972) 39
- (81) D.H. MEADOWS und O. JARDETZKY, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 61 (1968) 406
- (82) H.W. WYCKOFF, K.D. HARDMAN, N.M. ALLEWELL, T. INAGAMI, L.N. JOHNSON und F.M. RICHARDS, JBC, 242 (1967) 3984
- (83) N.L.R. KING und J.H. BRADBURY, Nature (London), 229 (1971) 404
- (84) M. SELA und CH.B. ANFINSEN, BBA, 24 (1957) 229
- (85) R. SHAPIRA, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1 (1959) 236
- (85 a) P.J. VITHAYATHIL, A.S. ACHARYA und B.N. MANJULA, Conform. Biopolymers, Papers Intern. Symp., Univ. Madras, 1 (1967) 291, Academic Press, New York
- (86) C.H.W. HIRS, Brookhaven Symposia in Biol., 15 (1962) 154
- (87) H.R. MAHLER und E.H. CORDES, Biological Chemistry, 1969, S. 10 ff., Harper und Row, New York
- (88) D.G. SMYTH, W.H. STEIN und S. MOORE, JBC, 238 (1963) 227
- (89) G. KORTUM, W. VOGEL und K. ANDRUSSOW, Pure Appl. Chem., 1 (1960) 189
- (90) D.H. MEADOWS, O. JARDETZKY, R.M. EPAND, H.H. RÜTERJANS und H.A. SCHERAGA, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 60 (1968) 766

- (91) J.H. GRIFFIN, J.S. COHEN und A.N. SCHECHTER, Biochemistry, 12 (1973) 2096
- (92) C. MIGCHELSEN und J.J. BEINTEMA, J. Mol. Biol., 79 (1973) 25

Lebenslauf

Ich wurde am 2. 10. 1940 in Chemnitz geboren. Im Jahre 1944 siedelten meine Eltern Dr. Herbert Müller und Elisabeth, geb. Irmer, nach Regensburg um, wo ich die Grundschule und von 1951 bis 1961 das humanistische Alte Gymnasium besuchte. Nach dem Abitur studierte ich an der Technischen Hochschule München Chemie. Dieses Studium beendete ich 1967 mit einer am Institut für Technische Chemie unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. h. c. F. Patat und Priv. Doz. Dr. G. Talsky ausgeführten Diplomarbeit mit dem Titel: "Zur Kinetik der Hydrolyse von cyclischem Cytidin-2', 3'-monophosphat durch Ribonuclease". In der Zeit vom April 1968 bis April 1970 führte ich am gleichen Institut meine Doktorarbeit aus, die den Titel trägt: "Zur Ermittlung kinetischer Parameter und deren Temperaturverhalten bei der Hydrolyse von Ribonucleinsäure und cyclischem Cytidin-2', 3'-monophosphat durch Ribonuclease". Auf Grund dieser Arbeit und einer mündlichen Prüfung wurde mir am 15. 6. 1970 der Grad eines Doktors der Naturwissenschaften verliehen.

Seit Oktober 1968 studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München Human-Medizin. Ich absolvierte im Verlauf dieses Studiums 1969 die Naturwissenschaftliche Vorprüfung und 1971 die Ärztliche Vorprüfung. Im Juni 1972 begann ich unter der Anleitung von Priv. Doz. Dr. G. Talsky und Priv. Doz. Dr. H. Fritz meine medizinische Doktorarbeit mit experimentellen Arbeiten über die pH-Abhängigkeit von Unstetigkeiten der enzymatischen Ribonuclease-Aktivität.

München, den 29. Juli 1974

